

ANA PAULA GORI PALKA

**DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES E MAPEAMENTO  
DAS REGIÕES ANTIGÊNICAS DA PROTEÍNA VP3 PARA DIAGNÓSTICO  
DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção  
do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Palka, Ana Paula Gori

Desenvolvimento de antígenos recombinantes e mapeamento das regiões antigênicas da proteína VP3 para diagnóstico da doença infecciosa da bursa. / Ana Paula Gori Palka. – Curitiba, 2016.

114 f.: il. color. ; 30cm.

Orientadora: Daniela Parada Pavoni

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Antígenos Virais. 2. Vírus da Doença Infecciosa da Bursa. 3. Proteína VP3, IBDV. I. Título II. Pavoni, Daniela Parada III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.292

# Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná



## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

**Profa. Dra. Daniela Parada Pavoni**  
Orientadora e presidente da banca  
Instituto Carlos Chagas – ICC

APROVAÇÃO

**Profa. Dra. Elizabeth Santin**  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Aprovação

**Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVAÇÃO

**Profa. Dra. Paola Alejandra Fiorani Celedón**  
Instituto Carlos Chagas - ICC

Aprovação

**Profa. Dra. Flávia Raquel Gonçalves Carneiro**  
Instituto Carlos Chagas - UFPR

APROVAÇÃO

### Suplentes:

**Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso**  
Instituto Carlos Chagas – ICC

**Profa. Dra. Juliana Spetotto Brum**  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Após arguir a candidata **Ana Paula Gori Palka**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Desenvolvimento de antígenos recombinantes e mapeamento das regiões antigênicas da proteína VP3 para diagnóstico da doença infecciosa da Bursa", são de parecer favorável à..... da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Agosto de 2016.



Centro Politécnico

Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas

Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil

Fone: 55.41.3361-1676

Dedico a Rodrigo e Pedro.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que me concedeu esta conquista.

Agradeço à minha orientadora e amiga Daniela, pela confiança, que me assumiu como aluna e muito contribuiu para o enriquecimento da minha vida profissional.

Ao Dr. Stenio pelo auxílio no delineamento dos experimentos e pela disponibilidade de colaborar e discutir os resultados.

À amiga Tatiana por compartilhar comigo esta jornada, sempre disposta a me ajudar.

Aos colegas Claudemir e Danilo por compartilhar seus conhecimentos.

Ao ICC pela oportunidade de desenvolver o projeto nesta instituição.

Ao Dr. Marco Krieger pelo apoio e suporte.

Ao Tecpar nas pessoas dos diretores Julio Felix e Julio Salomão pela liberação de parte da minha jornada de trabalho para possibilitar este trabalho.

A Maria Lenita pelo incentivo e apoio desde o início desta jornada.

Aos colegas Guilherme, Cesar e Marta pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Alimentos Israel, Suzete, Marcia, Lilian, Carolina, Luzia, Heloisa pelo incentivo.

A Adriana pelo apoio nos experimentos com células de insetos.

Aos colegas do Laboratório de Genômica pela convivência, companheirismo e experiências trocadas.

A Fernanda pelo companheirismo e suporte técnico no Laboratório de Genômica.

A Josiane por intermediar nosso contato com o Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.

Ao pessoal do preparo, Nilson, Sílvio, Tânia e Cibelli, pelo apoio operacional.

Ao Sr. Thiago Frasson - da Granja Econômica Avícola, às Sras Maria Constantza Rodriguez e Mara Eliza Gasino Joineau – Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, à Srta Nayara F. B. dos Santos, à Sra Célia Kania Ferreira e à Profa Dra Elizabeth Santin pela doação dos soros.

Às secretárias Maria Cristina (ICC) e Marlene (UFPR) pelo suporte.

Aos meus pais e minha família pelo apoio, incentivo e compreensão.

A todos que contribuíram e torceram por mim.

## RESUMO

A doença infecciosa da bursa (IBD) ou doença de Gumboro é uma doença viral de galinhas (*Gallus gallus*) relevante para o comércio internacional de animais e de seus produtos. Está associada à mortalidade e imunossupressão dos animais. Considerando a importância econômica da avicultura para o Brasil e o estado do Paraná, é obrigatório a tomada de medidas de controle em granjas comerciais, que visem a prevenção de surtos e a vigilância sobre o aparecimento de novas variantes, mais patogênicas, e que não respondem às vacinas. Testes diagnósticos confiáveis são ferramentas importantes no controle dessa infecção. A utilização de proteínas recombinantes como substrato de testes sorológicos é uma atraente alternativa para a produção nacional de reagentes, uma vez que os testes atualmente utilizados são importados. Sequências das proteínas antigênicas VP2 e VP3 de cepas brasileiras e estrangeiras, selvagens e vacinais foram buscadas no banco de dados do NCBI e alinhadas utilizando o programa *ClustalW*. Foram selecionadas 10 sequências nucleotídicas para síntese comercial clonadas no pUC57, das quais 9 da VP2 e uma da VP3. Os genes sintéticos foram clonados no vetor pET-28a (Novagen) para expressão em *Escherichia coli* e pMIB/V5-His (Invitrogen) para expressão em células de insetos. Fragmentos da VP3 foram obtidos por PCR fusionados à GFP para aumentar a massa molecular dos peptídeos. A expressão da VP2 em células de insetos e em *E. coli* não foi obtida. A VP3 e os fragmentos foram expressos na cepa BL 21 Star. A VP3 foi expressa em corpos de inclusão e solubilizada com 2 M de ureia. Os fragmentos foram obtidos na fração solúvel. A purificação das proteínas foi realizada por afinidade em resina de níquel. A reatividade da VP3 e fragmentos foi testada no teste de ELISA indireto. O teste de ELISA da VP3 com soros de animais vacinados e não vacinados apresentou 93,75% de sensibilidade e 85,19% de especificidade. Utilizando somente soros de animais imunizados o teste de ELISA apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. O mapeamento das regiões antigênicas da VP3 mostrou duas regiões, fragmentos 2 e 7, que concentraram maior número de epitopos. Os fragmentos 5, 6, e 7 foram as regiões da VP3 mais reativas. Este estudo mostrou que a proteína recombinante VP3 pode ser utilizada para avaliar o *status* imunológico pós-vacinal das aves. A utilização da VP3 recombinante para diagnosticar a presença/ausência da doença em animais não vacinados deve ser melhor avaliada utilizando uma amostragem maior desses animais no teste de ELISA. Através dos resultados do mapeamento foi possível estabelecer regiões da proteína VP3 mais antigênicas, entretanto mais testes devem ser conduzidos antes de considerar a utilização dos fragmentos no diagnóstico do vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) em galinhas.

Palavras-chave: doença infecciosa da bursa, doença de Gumboro, proteína recombinante, vírus da doença infecciosa da bursa, proteína VP2, proteína VP3, mapeamento de regiões antigênicas, teste de ELISA, diagnóstico da doença infecciosa da bursa.

## ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) or Gumboro disease is a viral disease of chickens (*Gallus gallus*) relevant to international trade in animals and their products. It is associated with mortality and immunosuppression in animals. Considering the economic importance of poultry production to Brazil and to the state of Paraná, taking control measures on commercial farms is mandatory for the prevention of outbreaks and surveillance of the appearance of new more pathogenic variants that do not respond to vaccines. Reliable diagnostic tests are important tools in the control of this infection. The use of recombinant proteins as serological tests substrates is an attractive alternative to the domestic production of reagents, since the currently used tests are imported. Sequences of antigenic proteins VP2 and VP3 of Brazilian and foreign strains, wild and vaccine were sought in the NCBI database and aligned using the ClustalW program. Ten nucleotide sequences were selected, 9 sequences of VP2 and one of VP3. These sequences were commercially synthesized and cloned into pUC57. The synthetic genes were cloned into pET-28a vector (Novagen) for expression in *Escherichia coli* and into pMiB/V5-His (Invitrogen) for expression in insect cells. Fragments obtained by PCR using VP3 as template were used fused to GFP to increase the molecular weight of the peptides. Expression of VP2 in insect cells and *E. coli* was not obtained. The VP3 and the fragments were expressed in BL 21 Star strain. The VP3 was expressed in inclusion bodies and was solubilized with 2 M urea. The VP3 fragments were obtained in the soluble fraction. Purification of the protein was accomplished by nickel affinity resin. The reactivity of VP3 and fragments was tested by ELISA. The ELISA test with VP3 sera of animals vaccinated and non-vaccinated showed sensitivity of 93.75% and specificity of 85.19%. Using only the sera of immunized animals ELISA showed sensitivity and specificity of 100%. Mapping the antigenic regions of VP3 showed that two regions, fragments 2 and 7, present the highest proportion of epitopes. Fragments 5, 6, and 7 were the most reactive VP3 regions. This study showed that the recombinant protein VP3 can be used to assess post-vaccination immune status of the birds. The use of recombinant VP3 for diagnosing the presence / absence of the disease in non-vaccinated animals should be further evaluated using a larger sample of these animals in the ELISA test. Through the results of the mapping it was possible to establish regions of more antigenic protein VP3, though more tests should be conducted before considering the use of fragments in the diagnosis of IBDV in chickens.

**Keywords:** infectious bursal disease, Gumboro disease, recombinant protein, infectious bursal disease virus, VP2 protein, VP3 protein, mapping of antigenic regions ELISA test, diagnosis of infectious bursal disease.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA.....	15
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SEGMENTOS A E B DO GENOMA DO IBDV, MOSTRANDO O PROCESSAMENTO DAS PROTEÍNAS.....	16
FIGURA 3. ESTRUTURA DA VP2.....	18
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA VP3.....	20
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a.....	30
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR DE EXPRESSÃO pMIB/V5-His.....	31
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR pEGFP-C3.....	31
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR pGEM-T Easy.....	32
FIGURA 9. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA PORÇÃO CENTRAL DE 35 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA VP2 REALIZADO COM O PROGRAMA ClustalW.....	45
FIGURA 10. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE 29 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA VP3 REALIZADO COM O PROGRAMA ClustalW.....	47
FIGURA 11. DNA DOS GENES SINTETIZADOS NO pUC57.....	48
FIGURA 12. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS PROTEÍNAS 1VP2ec, 2VP2ec e VP3 PARA EXPRESSÃO EM BACTÉRIAS.....	49
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FRAGMENTAÇÃO DA SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA VP3.....	49
FIGURA 14. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DOS FRAGMENTOS FA, FM E FP DA VP3 PARA EXPRESSÃO EM BACTÉRIAS.....	50
FIGURA 15. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DOS FRAGMENTOS F1 AO F7 DA VP3 E DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 PARA EXPRESSÃO EM BACTÉRIAS.....	51
FIGURA 16. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS PROTEÍNAS 1VP2IN, 2VP2IN PARA EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETOS.....	52
FIGURA 17. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 PARA EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETOS.....	53
FIGURA 18. REAÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA DOS VETORES DE EXPRESSÃO E DO pUC57.....	55
FIGURA 19. INICIADORES F E R PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA GFP.....	57
FIGURA 20. CLONAGEM DA GFP NOS VETORES DE EXPRESSÃO.....	58
FIGURA 21. CONFIRMAÇÃO POR <i>TOOTHPICK</i> DO CLONE DE GFP RECOMBINANTE EM pET-28a.....	59
FIGURA 22. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GFP EM PLACA DE LB-ÁGAR CONTENDO CANAMICINA (50 µg / ml) E IPTG.....	59
FIGURA 23. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 E DOS FRAGMENTOS 1 A 7 DA VP3.....	61
FIGURA 24. TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VP2 COM A CEPA E. coli Shuffle.....	64
FIGURA 25. TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP2 COM A CEPA E. coli BL21 Star.....	65
FIGURA 26. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP2 COM A CEPA E. coli Shuffle EM LARGA ESCALA.....	66



FIGURA 27. TESTE DE EXPRESSÃO DA VP3 COM A CEPA E. coli BL21 Star. ....	68
FIGURA 28. QUANTIFICAÇÃO DA VP3 ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO COM A CURVA DE BSA. .	69
FIGURA 29. TESTE DE EXPRESSÃO DE F4 E F7 EM E. coli BL21 Star. ....	71
FIGURA 30. PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL DOS FRAGMENTOS 1 AO 7 DA PROTEÍNA VP3. ....	72
FIGURA 31. DESNATURAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA VP3 FUSIONADOS À GFP POR SDS-PAGE.....	73
FIGURA 32. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ANTERIOR, MÉDIO E POSTERIOR DA VP3. ...	74
FIGURA 33. <i>SLOT BLOT</i> REVELADO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA. ....	76
FIGURA 34. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:10000. ....	78
FIGURA 35. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:20000. ....	79
FIGURA 36. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:40000. ....	79
FIGURA 37. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). ....	80
FIGURA 38. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 PARA A IBD DE 107 SOROS DO PAINEL SOROLÓGICO. ....	82
FIGURA 39. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 PARA A IBD DE AMOSTRAS DE SOROS NEGATIVOS E POSITIVOS DE ANIMAIS VACINADOS E ANIMAIS COM ANTICORPOS MATERNOS. ....	83
FIGURA 40. PREDIÇÃO DO PERFIL DE ACESSIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA VP3, SEGUNDO EMINI ET AL., 1985. ....	85
FIGURA 41. PREDIÇÃO DE ANTIGENICIDADE DA PROTEÍNA VP3, SEGUNDO KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990. ....	86
FIGURA 42. GRÁFICO DAS MÉDIAS DAS D.O. OBTIDAS NO TESTE DE ELISA COM OS FRAGMENTOS NÃO FUSIONADOS À GFP E COM A rVP3. ....	88
FIGURA 43. ANTIGENICIDADE DA PROTEÍNA VP3 (PREDIÇÃO SEGUNDO KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990) E FRAGMENTOS. ....	90
FIGURA 44. SELEÇÃO DE PONTOS DE CUT-OFF OBTIDOS POR ANÁLISE DA CURVA ROC (EIXO X) EM FUNÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE (EIXO Y). ....	102

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. SEQUÊNCIAS DA VP2 OBTIDAS DO GENBANK. ....	46
TABELA 2. SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS VP2 E VP3 PARA TESTAR ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR A IBD E FRAGMENTOS DA VP3 PARA MAPEAR AS REGIÕES ANTIGÊNICAS. ....	54
TABELA 3. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS PROTEÍNAS VP2, VP3 E FRAGMENTOS. ....	57
TABELA 4. TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP2 EM <i>E. coli</i> . ....	62
TABELA 5. TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP3 EM <i>E. coli</i> . ....	67
TABELA 6. TESTE DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS 1 AO 7 DA PROTEÍNA VP3 EM <i>E. coli</i> . ....	70
TABELA 7. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE 137 SOROS ANALISADOS COM O TESTE COMERCIAL E A PROTEÍNA VP3 RECOMBINANTE NO <i>SLOT BLOT</i> . ....	76
TABELA 8. RESULTADOS DOS SOROS TESTADOS COM O TESTE COMERCIAL Idexx IBD Ab Test®. ....	77
TABELA 9. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE 107 SOROS DO PAINEL SOROLÓGICO OBTIDOS NA ANÁLISE DA CURVA ROC. ....	82
TABELA 10. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE SOROS DE ANIMAIS VACINADOS, DE ANIMAIS COM ANTICORPOS MATERNOS E DE ANIMAIS <i>NAIVE</i> OBTIDOS NA ANÁLISE DA CURVA ROC. ....	83
TABELA 11. RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS ROC PARA OS DOIS GRUPOS ANALISADOS: ANIMAIS VACINADOS, COM ANTICORPOS MATERNOS, NÃO VACINADOS E <i>NAIVE</i> . ....	84
TABELA 12. AMOSTRAS COM ANTICORPOS NÃO VACINAIS TESTADAS COM ELISA rVP3. ....	84
TABELA 13. PREDIÇÃO DOS EPITOPOS DA PROTEÍNA VP3 SEGUNDO OS MÉTODOS DE EMINI E KOLASHAR;TONGAONKAR. ....	87
TABELA 14. REGIOES ANTIGÊNICAS DA PROTEÍNA VP3 CITADAS NA LITERATURA. ....	88
TABELA 15. RESULTADOS DA D.O. DO TESTE DE ELISA COM OS FRAGMENTOS NÃO FUSIONADOS À GFP. ....	89
TABELA 16. FRAGMENTOS 1 AO 7 DA VP3 POSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NA PROTEÍNA INTEIRA E NÚMERO DE SOROS REATIVOS EM CADA FRAGMENTO. ....	91
TABELA 17. RESULTADOS DA D.O. DO TESTE DE ELISA COM OS FRAGMENTOS 1 AO 7 FUSIONADOS À GFP. ....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

AUC – área sob a curva ROC

D.O. – densidade ótica

IBD – doença infecciosa da bursa

IBDV – vírus da doença infecciosa da Bursa

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

GFP – *green fluorescent protein*

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

ROC - *receiver operator characteristic*

rVP3 – proteína VP3 recombinante

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SPF –animais livres de agentes patogênicos

VLP – *virus-like particles*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 HISTÓRICO.....	14
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO .....	14
2.3 PROTEÍNAS ESTRUTURAIS .....	16
2.4 ANTIGENICIDADE E VIRULÊNCIA.....	19
2.5 DOENÇA .....	21
2.6 CONTROLE.....	22
2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	24
3 OBJETIVOS .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1 SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E PROTEICAS .....	26
4.2 GENES SINTÉTICOS .....	26
4.3 <i>Escherichia coli</i> E CÉLULAS DE INSETOS.....	26
4.4 REAGENTES, SOLUÇÕES E MEIOS .....	27
4.5 VETORES .....	30
4.6 PREPARO DE CÉLULAS CÁLCIO COMPETENTES .....	32
4.7 TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> CÁLCIO COMPETENTE .....	33
4.8 PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL .....	33
4.9 AMPLIFICAÇÃO POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) .....	34
4.10 ELETROFORESE DE DNA.....	34
4.11 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	36
4.12 REAÇÃO DE DIGESTÃO.....	36
4.13 REAÇÃO DE DESFOSFORILAÇÃO .....	36
4.14 REAÇÃO DE LIGAÇÃO .....	36
4.15 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES .....	37
4.15.1 TÉCNICA DE PALITAGEM ( <i>TOOTH PICK</i> ) .....	37
4.15.2 PCR DE COLÔNIA.....	37
4.16 SEQUENCIAMENTO .....	38
4.17 TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM <i>E. coli</i> .....	38
4.18 SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS INSOLÚVEIS.....	39
4.19 PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL .....	39
4.20 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	40
4.21 <i>WESTERN BLOT</i> .....	40
4.22 <i>SLOT BLOT</i> REVELADO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA .....	41
4.23 TESTE DE ELISA INDIRETO .....	41
4.24 CULTIVO E TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS DE INSETOS .....	42
4.25 SOROS.....	43

5 RESULTADOS .....	44
5.1 SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS .....	44
5.2 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM.....	48
5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO .....	53
5.4 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS VP2 E VP3 COMPLETAS .....	55
5.5 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS FA, FM E FP .....	56
5.6 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 E FRAGMENTOS F1 A F7 .....	56
5.6.1 OBTENÇÃO DA GFP.....	57
5.6.2 CLONAGEM DA GFP NO VETOR pET-28a.....	58
5.6.3 CLONAGEM DA GFP NO VETOR pMIB/V5-HIS .....	60
5.6.4 CLONAGEM NOS VETORES pET-28a-GFP E pMIB/V5-HIS-GFP .....	61
5.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS.....	62
5.7.1 PROTEÍNA VP2 .....	62
5.7.2 PROTEÍNA VP3 .....	66
5.7.2.1 INDUÇÃO .....	66
5.7.2.2 SOLUBILIZAÇÃO DA VP3 E PURIFICAÇÃO.....	68
5.7.3 FRAGMENTOS DA VP3 FUSIONADOS À GFP .....	69
5.7.3.1 INDUÇÃO .....	69
5.7.3.2 PURIFICAÇÃO .....	71
5.7.4 FRAGMENTOS DA VP3 NÃO FUSIONADOS À GFP (FA, FM, FP).....	73
5.7.4.1 INDUÇÃO .....	73
5.7.4.2 PURIFICAÇÃO .....	74
5.8 SOROS.....	75
5.9 <i>SLOT BLOT</i> .....	75
5.10 TESTE DE ELISA.....	76
5.10.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3.....	78
5.10.2 TESTE DE ELISA COM A rVP3.....	80
5.11 MAPEAMENTO DAS REGIÕES ANTIGÊNICAS .....	84
6 DISCUSSÃO .....	93
6.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	95
6.2 SOROS.....	99
6.3 <i>SLOT BLOT</i> .....	99
6.4 TESTE DE ELISA COM A rVP3.....	100
6.5 MAPEAMENTO DAS REGIÕES ANTIGÊNICAS .....	102
7 CONCLUSÕES .....	105
8 REFERÊNCIAS .....	106

## 1 INTRODUÇÃO

No setor avícola, o Brasil é líder em exportação mundial de carne de frango exportando para 142 países (MAPA, 2016). Até junho de 2016, foram exportados US\$FOB 3 bilhões de carne de aves, o que representa o terceiro lugar no ranking de exportação do agronegócio brasileiro, à frente das exportações das carnes bovina e suína (MDIC, 2016). Em 2015, o Brasil foi o segundo produtor mundial de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos. O mercado interno consumiu 67,3% da produção brasileira de carne de frango, enquanto 32,7% foram exportados. O estado do Paraná se destaca com 32,46% da produção brasileira e 35,7% da exportação de carne de frango (ABPA, 2016). Devido à relevância da avicultura na economia do país é preciso garantir a produtividade, e a sanidade dos plantéis de aves domésticas é um aspecto de fundamental importância para o bom desempenho do setor.

A doença infecciosa da bursa (IBD) ou doença de Gumboro é causada por um vírus da família Birnaviridae que afeta aves da espécie *Gallus gallus* e tem grande importância econômica para a atividade avícola. Devido à importância sócio-econômica, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) incluiu esta doença na lista de doenças notificáveis (OIE, 2016). A vacinação das aves é a principal forma de controle dessa doença em condições de produção intensiva. O *status* da imunização pós-vacinal é rotineiramente avaliado com testes diagnósticos importados. Para diminuir os custos da produção, o desenvolvimento de testes diagnósticos nacionais é relevante e viável economicamente.

O vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) apresenta altas taxas de mutação favorecendo o surgimento de diferentes cepas antigênicas, e cada vez mais virulentas. A doença, quando não é fatal, causa imunossupressão como consequência da infecção viral diretamente direcionada para os linfócitos B. Os animais imunossuprimidos são afetados por infecções oportunistas decorrentes de diferentes patógenos. Ademais, interfere na resposta imune decorrente do intensivo programa de vacinação a que os animais são submetidos em granjas comerciais. A mortalidade e/ou o comprometimento do desenvolvimento do animal causam um impacto econômico e social na indústria. A condição de imunossupressão favorece o aparecimento de infecções zoonóticas relevantes, tais como, por *Campilobacter*, salmonelose e influenza aviária com um impacto considerável na saúde pública. Em relação a esta última, a ameaça é real, como vimos acontecer com os últimos surtos da influenza aviária na Ásia, onde

cepas virais pouco patogênicas circulantes em aves tornaram-se altamente virulentas quando transmitidas ao homem (SWAYNE et al., 2015). Por fim, o aumento de medicamentos, como por exemplo os antibióticos, para tratar infecções oportunistas decorrentes de bactérias, aumenta o risco da presença de resíduos destes medicamentos na carne e meio ambiente, levando ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos.

Kits diagnósticos para detectar a IBD são, em geral produzidos com a partícula viral. Sua produção requer cuidados especiais no manuseio do virion que deve ser realizado em condições seguras de contenção. Além disso, pode haver dificuldade de adaptação de cepas muito patogênicas na cultura celular. Como os kits são importados, é possível que sejam produzidos com cepas não circulantes no país, o que diminui a sensibilidade do teste. A substituição da partícula viral por antígenos recombinantes na produção de kits diagnósticos é uma alternativa viável do ponto de vista econômico, tecnológico, de biossegurança e mais adequado para caracterizar a variabilidade genética da doença no país.

O objetivo deste estudo foi desenvolver antígenos recombinantes e avaliar seu desempenho no teste de ELISA para ser utilizado na detecção da doença IBD e na verificação do *status* imunológico de animais em granjas comerciais. Espera-se, com isso, desenvolver uma tecnologia nacional que contribua para o diagnóstico das cepas circulantes no país, além da redução dos custos no controle desta doença. Outro objetivo foi identificar os epitopos da proteína recombinante desenvolvida através da reatividade dos anticorpos policlonais e investigar a utilização destas regiões antigênicas para aplicação em testes diagnósticos mais eficientes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO

Em 1957, ocorreram surtos de uma síndrome, até então desconhecida, em uma granja na região de Gumboro, em Delaware nos Estados Unidos causando até 10% de mortalidade de frangos. A doença foi descrita por Albert S. Cosgrove (1962), citado por Lasher e Davis (1997), como uma nefrose aviária devido a uma proeminente lesão renal, e mais tarde, reconhecida como doença de Gumboro. A doença foi disseminada nos Estados Unidos (LASHER; DAVIS, 1997; MÜLLER et al., 2003; ETERRADOSSI; SAIF, 2013). Posteriormente, a síndrome foi melhor caracterizada e designada como doença infecciosa da bursa (CHO; EDGAR, 1972) e a estrutura do vírus não envelopado com genoma de RNA bissegmentado foi descrita (NICK et al., 1976). No Brasil, a doença foi diagnosticada pela primeira vez em 1972 por Nakano et al. (citado por SCANAVINI NETO et al., 2004).

### 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

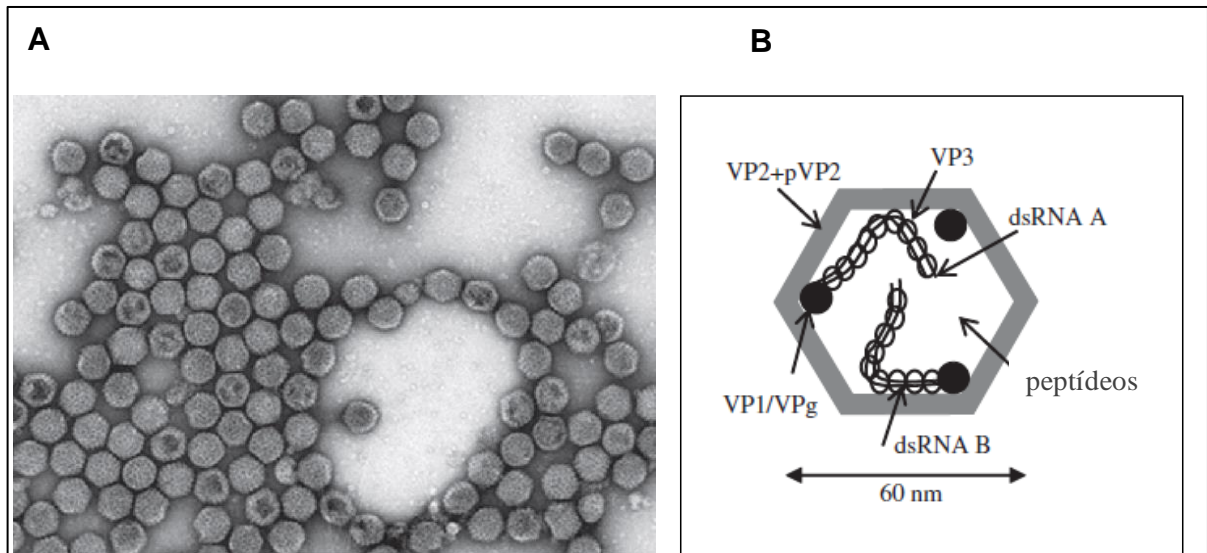
O *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* classifica o IBDV na família Birnaviridae e no gênero *Arvibirnavírus* com genoma composto por dois segmentos de duas fitas de RNA (MÜLLER et al., 1979). Nesta família, também estão incluídos vírus dos gêneros *Entombirnavírus* que afetam insetos e *Aquabirnavírus* e *Blosnavírus* que afetam peixes e moluscos bivalves (ICTV, 2012; Viralzone, 2016).

O vírus da IBD é um vírus icosaédrico, diâmetro de aproximadamente 65 nm, não envelopado e com genoma composto por dois segmentos de fita dupla de RNA (HIRAI; SHIMAKURA, 1974; HARKNESS et al., 1975; BÖTTCHER et al., 1997) (FIGURA 1A). O capsídeo é formado por 780 unidades da proteína VP2, arranjada em 260 trímeros. Seu genoma está protegido por complexos ribonucleoproteicos (BÖTTCHER et al., 1997; LUQUE et al., 2009; ICTV, 2012).



FIGURA 1. VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA.

A. ELETROMICROGRAFIA POR CONTRASTE NEGATIVO DO IBDV. B. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CAPSÍDEO E GENOMA DO IBDV. dsRNA A: SEGMENTO MAIOR DE RNA DUPLA FITA; dsRNA B: SEGMENTO MENOR DE RNA DUPLA FITA; VP2: PROTEÍNA VP2; pVP2: PROTEÍNA VP2 NÃO PROCESSADA; VP1: PROTEÍNA VP1; VPg: PROTEÍNA VP1 ASSOCIADA AO GENOMA; VP3: PROTEÍNA VP3.



FONTE: adaptado de ICTV, 2012

Os segmentos de RNA, diferentes em tamanho, são denominados A e B, com peso molecular de  $2,2$  a  $2,6 \times 10^6$  Da e  $1,9$  a  $2,2 \times 10^6$  Da, respectivamente (DOBOS et al., 1979; MÜLLER; NITSCHKE, 1987a) (FIGURA 1B). O menor segmento de RNA com 2800 pb codifica a proteína VP1, uma RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) encontrada livre na partícula viral ou associada ao genoma como VPg para funcionar como um iniciador da replicação (MÜLLER; NITSCHKE, 1987b; TACKEN et al., 2004). O segmento maior de RNA com 3200 pb apresenta um pequeno quadro de leitura aberta (ORF) parcialmente sobreposto a um ORF maior. O ORF menor codifica a proteína VP5 envolvida na liberação do virion da célula infectada e não é necessária para a replicação do vírus (MUNDT et al., 1995; WU et al., 2009). O ORF maior codifica a poliproteína N-pVP2-VP4-VP3-C (~110 kDa) co-traducionalmente autocatalisada nas proteínas pVP2, VP3 e VP4. A pVP2 ou preVP2 (~ 54,4 kDa) é processada na sua extremidade C-terminal, pela protease VP4, gerando a VP2 madura (~ 47 kDa) e pequenos peptídeos. As proteínas VP2 e VP3 são constituintes do capsídeo do vírus (MÜLLER; BECHT, 1982; AZAD et al., 1987; JAGADISH et al., 1988; BAYLISS et al., 1990). Os peptídeos originados do processamento da pVP2 participam na montagem do capsídeo e na entrada do genoma na célula alvo (DA COSTA et al., 2002). O IBDV



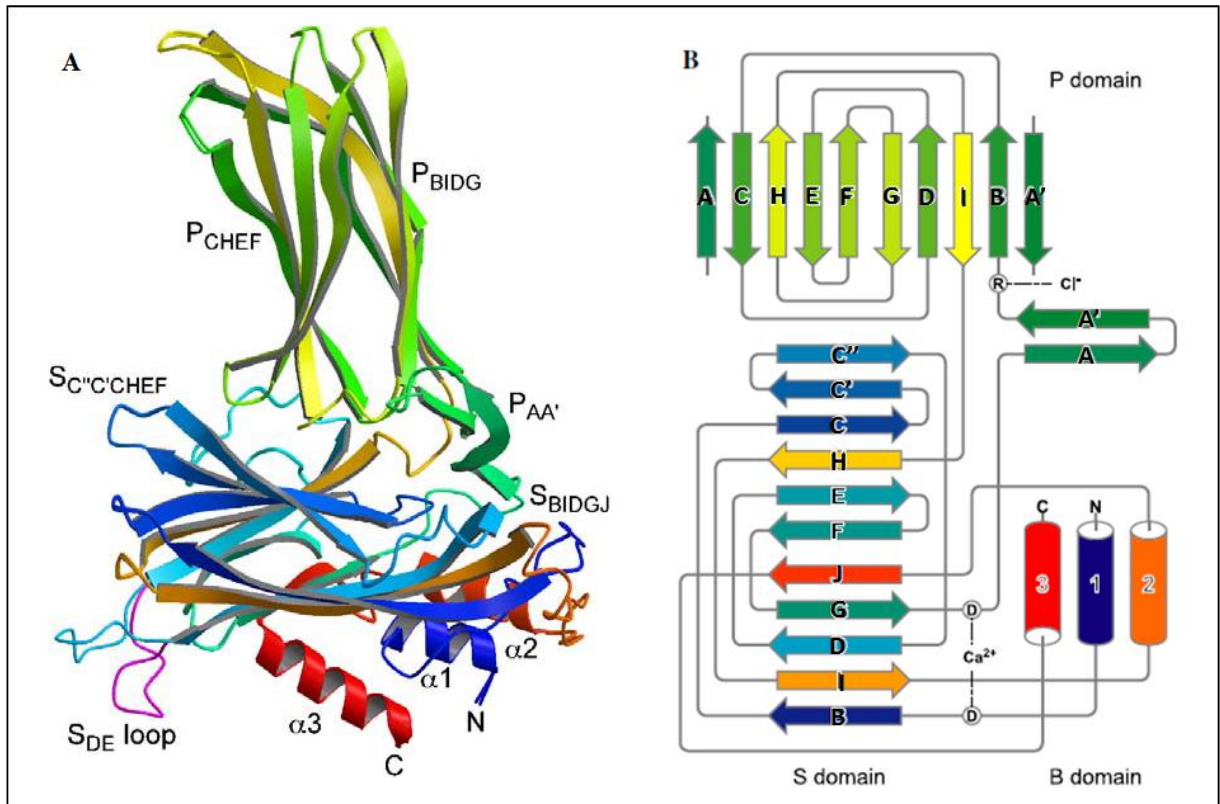
localizados na região central e variável da proteína (AZAD et al., 1987; BAYLISS et al., 1990; HEINE et al., 1991; WANG et al., 2005). Regiões antigênicas localizadas nas extremidades N e C-terminais foram identificadas (AZAD et al., 1987; BECHT; MULLER, 1988; AZAD et al., 1991; PRADHAN et al., 2012).

A estrutura cristalográfica da VP2 indicou que a proteína é dobrada formando três domínios. A base (B) é um domínio menor em alfa hélice onde se localizam as regiões conservadas N e C-terminais da proteína. O domínio “shell” (S) é um domínio em folha beta central na organização da molécula. O domínio de protusão (P), também em folha beta, é formado pela região hipervariável da VP2, situada entre os aminoácidos 204 e 350 e localizados na superfície mais externa da proteína. O domínio P apresenta quatro loops das folhas beta que estariam associados à região de variabilidade, P<sub>BC</sub>, P<sub>DE</sub>, P<sub>FG</sub> e P<sub>HI</sub> (FIGURA 3). Os loops são alvos dos anticorpos neutralizantes. Há duas regiões hidrofílicas entre os aminoácidos 210 a 225 e 312 a 324 localizadas nas fitas P<sub>B</sub>/P<sub>C</sub> e P<sub>H</sub>/P<sub>I</sub>. A presença de íons de cálcio no domínio S são importantes para estabilizar a estrutura trimérica da VP2 (COULIBALY et al., 2005; LEE et al., 2006; LETZEL et al. 2007).

A VP2 é o antígeno que induz a produção de anticorpos protetores contra o IBDV. Na forma de VLP (*virus-like particles*) é produzida em diversos sistemas de expressão e constitui uma alternativa segura e econômica para substituir os vírus atenuados ou ativados quimicamente na produção de vacinas e testes sorológicos (NOAD; ROY, 2003). O sistema eucariótico para produção da VP2 é indicado para obter o correto dobramento da molécula e formar os epitopos conformacionais. O sistema de baculovírus tem sido utilizado pois é capaz de manter as funções biológicas da VP2 recombinante (MARTINEZ-TORRECUADRADA et al., 2000b; WANG et al., 2000; LEE et al., 2004; XU et al., 2011). Ge et al. (2015) verificaram a resposta vacinal em animais imunizados com a VP2 e a VP2/3/4 expressas em células de inseto com o sistema baculovírus e diferentes elementos regulatórios, para aumentar a eficiência da expressão, e obtiveram proteção efetiva para VP2 e VP2/3/4 de 95,8% e 100%, respectivamente. Martinez-Torrecuadrada et al. (2000a) desenvolveram testes diagnósticos com a pVPX (pVP2 não processada) expressa no sistema de baculovírus. Os testes apresentaram correlação  $R^2=0,82$  com um teste comercial produzido com vírus vivo e 100% de sensibilidade se comparado com o teste de soroneutralização. Outros sistemas eucarióticos, como leveduras (DEY et al., 2009; ARNOLD et al., 2012; WANG et al., 2016) e plantas (GÓMEZ et al., 2013) também foram avaliados.

FIGURA 3. ESTRUTURA DA VP2.

A. DOMÍNIO S (SHELL): FOLHAS BETA *BIDGJ* E *C'C'CHEF*; DOMÍNIO P (DE PROTUSÃO) FITAS *AA'*, FOLHAS BETA *BIDG* E *CHEF*; DOMÍNIO B (BASE) HÉLICES  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . B. DIAGRAMA DA VP2 APRESENTANDO AS MESMAS ESTRUTURAS DE A.



FONTE: LEE et al., 2006.

A expressão em procariotos, embora seja mais simples e econômica que os outros sistemas, apresenta limitações, pois a proteína é formada em corpos de inclusão e não atinge a condição ideal de conformação, sendo pouco imunogênica. Várias estratégias são avaliadas para melhorar a solubilidade neste sistema, como a utilização de proteínas de fusão (SEDIGHZADEH et al., 2012; JIANG et al., 2016) e a utilização de vetores bacterianos alternativos (RONG et al., 2007).

A proteína VP3 não apresenta a mesma variabilidade que a VP2 (BAYLISS et al., 1990). Os epitopos identificados na VP3 não são neutralizantes e estão associados especificamente a um sorotipo ou aos dois sorotipos (OPPLING et al., 1991; PITCOVSKI et al., 1999). Os epitopos foram mapeados entre os aminoácidos 864 a 945 da poliproteína e nas regiões N e C-terminais da VP3, reconhecidos por anticorpos monoclonais contra fragmentos da proteína expressos em *Escherichia coli* (JAGADISH; AZAD, 1991; MAHARDIKA; BECHT, 1995; YAMAGUCHI et al., 1996; DENG et al., 2007). Os anticorpos contra a VP3 são os primeiros que aparecem logo

após uma infecção (FAHEY et al, 1985). A VP3 expressa em *E. coli* foi eficiente para a detecção de anticorpos em testes sorológicos (WANG et al., 2008; SINGH et al., 2010), mas não apresentou bom desempenho quando foi expressa em células de insetos (MARTINEZ-TORRECUADRADA et al., 2000a).

A VP3 é uma proteína multifuncional. Além de interagir com ela mesma, na forma de dímeros de ribonucleoproteínas está associada ao genoma, compactando-o dentro do vírus (LUQUE et al., 2009). Localizada internamente no capsídeo, forma o arcabouço viral, e através de uma forte ligação da porção C-terminal com a VP2, estabiliza o capsídeo, mantendo sua integridade (BÖTTCHER et al., 1997; CHEVALIER et al., 2004; SAUGAR et al., 2005). A VP3 promove a atividade de polimerase RdRp da VP1, desempenhando um papel de fator de transcrição. A ligação com a VP1 ocorre na porção C-terminal hidrofílica e rica em aminoácidos carregados. A interação induz uma modificação conformacional no sítio ativo da VP1 que propicia a acomodação da fita de RNA formando complexos ribonucleoproteicos (BÖTTCHER et al., 1997; GARRIGA et al., 2007; CASAÑAS et al., 2008; FERRERO et al., 2015). Ademais, a porção C-terminal da VP3 constitui um domínio de oligomerização da proteína importante para montagem do capsídeo (MARAVÉ et al., 2003; MERTENS et al., 2015).

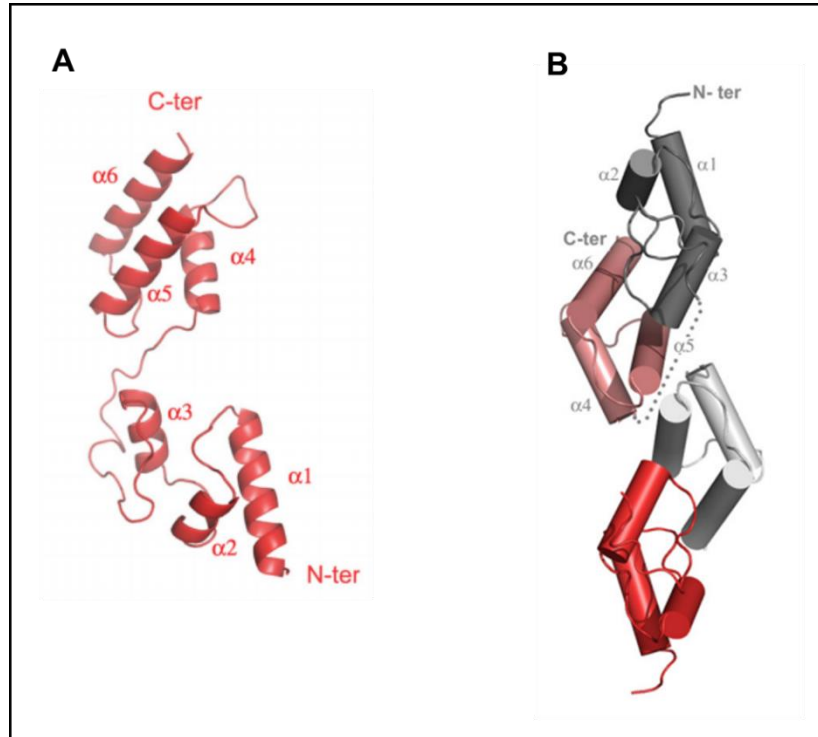
Pela análise da estrutura cristalográfica a VP3 está organizada como um dímero. A porção central consiste de dois domínios alfa-hélices conectados por uma longa dobra flexível. Cada domínio apresenta 3 regiões em alfa-hélices conectadas por loops (FIGURA 4). O domínio C-terminal apresenta semelhanças estruturais com fatores de transcrição (Casañas et al., 2008).

## **2.4 ANTIGENICIDADE E VIRULÊNCIA**

Dois sorotipos de IBDV são reconhecidos: os sorotipos I e II. Ambos foram isolados em galinhas e perus, mas somente o sorotipo I é patogênico para galinhas (MCFERRAN et al., 1980). As cepas do sorotipo 1 são classificadas de acordo com a antigenicidade e a patogenicidade em: cepas clássicas virulentas, muito virulentas e

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA VP3.

A. O PRIMEIRO DOMÍNIO N-TERMINAL APRESENTA TRÊS ESTRUTURAS EM ALFA-HÉLICE  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  E  $\alpha 3$ ; O SEGUNDO DOMÍNIO C-TERMINAL APRESENTA TRÊS ESTRUTURAS EM ALFA-HÉLICE  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  E  $\alpha 6$ . B. DIAGRAMA ILUSTRATIVO REPRESENTANDO A DIMERIZAÇÃO DA VP3. PROTÔMERO MOSTRANDO O DOMÍNIO N-TERMINAL EM VERMELHO E C-TERMINAL EM CINZA CLARO. PROTÔMERO MOSTRANDO DOMÍNIO C-TERMINAL EM ROSA E N-TERMINAL EM CINZA ESCURO.



FONTE: CASAÑAS et al., 2008

variantes antigênicas. Os determinantes antigênicos que controlam o padrão de reatividade do vírus estão associados a mutações de poucos aminoácidos localizados na região hipervariável da proteína VP2 (BAYLISS et al., 1990; LETZEL et al., 2007). A ocorrência de variantes antigênicas foi inicialmente relatada a partir da década de 80 nos Estados Unidos quando estudos revelaram que animais vacinados apresentavam sinais sub-clínicos da doença mostrando que a cobertura vacinal não oferecia proteção às novas variantes (SNYDER, 1990; SNYDER et al., 1992; MUNDT et al, 2003).

Desde o surgimento da IBD em 1957, predominavam as cepas clássicas virulentas dos vírus que eram bem controladas por vacinação e as taxas de mortalidade ficavam abaixo de 2%. A partir de 1984, na Europa, foram isoladas cepas muito virulentas que, embora semelhantes antigenicamente às cepas clássicas circulantes, causavam rápida atrofia da bursa, aumentavam consideravelmente a mortalidade das

aves, eram resistentes às vacinas comerciais e causavam infecções frente aos anticorpos maternos (SNYDER, 1990; BERG et al., 1991). As cepas muito virulentas disseminaram-se pelo mundo (NAGARAJAN; KIBENGGE, 1997; TO et al., 1999; ZIERENBERG et al., 2000; LIU et al., 2001), inclusive no Brasil (IKUTA et al., 2001; TESSARI et al., 2001; FERNANDES et al., 2012).

No Brasil, estudos realizados do perfil genético das cepas brasileiras vacinais e selvagens identificaram cepas clássicas virulentas e muito virulentas relacionadas às existentes nos Estados Unidos, Europa e Ásia, além de variantes brasileiras (IKUTA et al., 2001; FERNANDES et al., 2012).

Determinantes da virulência estão associados às proteínas VP1, VP2 ou a ambas. Próximo à segunda região hidrofílica da VP2, há um padrão de aminoácidos S-W-S-A-S-G-S localizado numa folha beta e conservado em cepas virulentas. Pontes de hidrogênio são formadas devido à presença de quatro serinas que facilitaria ligações moleculares do vírus ao hospedeiro. Em cepas não virulentas, uma ou duas serinas seriam substituídas por outros resíduos diminuindo a interação com a célula hospedeira e, assim, afetando a virulência (HEINE et al., 1991). Outros resíduos foram identificados na VP2, tais como, 249, 253 e 256, localizados no loop P<sub>DE</sub>, 272, 279 e 284, no loop P<sub>FG</sub> (BRANDT et al., 2001; LAZARUS et al., 2008; QI et al., 2009; QI et al., 2013). Na VP1 foram reconhecidos os resíduos 96, 161 e 276 como responsáveis pela virulência do IBDV (LAZARUS et al., 2008; FERNANDES et al., 2012; ESCAFFRE et al., 2013). Outros marcadores de virulência, ainda desconhecidos, podem determinar a patogenicidade do vírus (BOOT et al., 2000; BERG et al., 2004).

## 2.5 DOENÇA

O hospedeiro do sorotipo I do IBDV é a ave jovem da espécie *Gallus gallus*. Outras espécies de aves não desenvolvem a doença. A forma subclínica ocorre em aves menores de três semanas. As aves entre 3 e 6 semanas de idade apresentam sinais clínicos ou agudos. O vírus é transmitido via oral e atinge os linfócitos B imaturos da bursa de Fabricius, após algumas horas. Após um período de incubação de 2 a 3 dias, aparecem os sinais clínicos que incluem exaustão, prostração, desidratação, diarreia e penas eriçadas, associados à fase aguda da doença. No terceiro dia, a incidência de mortalidade é variável. Altas taxas de mortalidade ocorrem se a infecção envolver formas muito virulentas do vírus. Tanto na doença clínica como na subclínica,

ocorre imunossupressão, manifestada por infecções secundárias, caimento da conversão alimentar e interferência na resposta vacinal. As aves que sobreviverem, recuperam-se em 5 a 7 dias (SAIF, 1991; SHARMA et al., 2000; INGRAO et al., 2013).

As taxas de mortalidade são dependentes de fatores como cepa viral, idade do indivíduo, estado imunológico do lote, estado de estresse ambiental e infecções bacterianas secundárias. Até 1987, antes do surgimento das cepas variantes, a doença causava entre 1 a 2 % de mortalidade. Após este período, a mortalidade aumentou para 5% nos Estados Unidos. Na Europa e Ásia, com o surgimento das cepas muito virulentas, a mortalidade atingiu 91% em aves livres de patógenos (SFP) e 25% a 60% em aves de granjas (NUNOYA et al., 1992; BERG et al., 2004) e, no Brasil, as cepas hipervirulentas causaram perdas de 50% a 60% em aves de postura (TESSARI et al., 2001).

## **2.6 CONTROLE**

Medidas de biossegurança, tais como a limpeza e a desinfecção das áreas físicas, são adotadas objetivando a diminuição do risco de infecção e diminuição da contaminação (JAENISH, 2016; GAY; MUNDT, 2010; INGRAO et al., 2013). A vacinação é a principal medida de controle da IBD. O tipo de vacina, a época e as doses utilizadas são estabelecidas no programa de vacinação onde devem ser considerados vários aspectos como: os níveis dos anticorpos maternos, a cepa viral circulante, idade dos animais e disponibilidades das vacinas (KNEIPP, 2000). Duas estratégias de vacinação são utilizadas para garantir a imunidade em granjas comerciais de frangos de corte e poedeiras. A primeira consiste na imunização, com vacinas inativadas, das matrizes para garantir a presença de níveis altos de anticorpos maternos nas aves jovens, via imunidade passiva. As aves são mais suscetíveis aos vírus da IBD nas primeiras semanas de vida, e a presença de anticorpos maternos transmitidos à prole, através da gema dos ovos embrionados, garante a proteção até que a resposta adaptativa seja efetiva (FUSSELL, 1998; PARKER; DE WIT, 2014). A outra estratégia consiste na vacinação das aves jovens, com vacinas vivas atenuadas, para garantir a imunidade após o decaimento dos anticorpos maternos, entre a 4ª e 5ª semanas de vida. Os níveis de decaimento na prole são variáveis. A coexistência de aves com imunidade passiva insuficiente para proteção contra a doença, e aves com altos títulos



de anticorpos maternos que bloqueiam a ação dos vírus vacinais, interfere na imunização. O melhor tempo para a vacinação das aves jovens depende do título de anticorpos maternos, que pode ser avaliado por ELISA ou outra técnica (FUSSELL, 1998; BERG; MEULEMANS (1991); GHARAIBEH; MAHMOUD, 2013; AL-NATOUR et al., 2004; VAZIRY et al., 2014).

Os principais tipos de vacinas disponíveis atualmente para o controle da IBD são: vacinas vivas e atenuadas, vacinas inativadas, vacinas recombinantes e vacinas imuno-complexas (OIE, 2016). As vacinas vivas são produzidas com cepas virais parcialmente atenuadas por passagens seriadas em células animais cultivadas, ovos ou tecidos embrionários. Não precisam de adjuvantes para administração, e são baseadas em cepas clássicas virulentas. As vacinas vivas podem levar ao aparecimento de variantes mais virulentas se houver a reversão da virulência. Dependendo da eficácia frente à presença de anticorpos maternos, as vacinas vivas se apresentam nas seguintes formas: *mild*, *intermediate* e *intermediate plus* ou *hot*. Vacinas vivas *mild* são eficazes em aves com níveis baixos de anticorpos maternos. As vacinas *intermediate* imunizam frangos com níveis altos de anticorpos maternos, mas não protegem completamente contra as cepas muito virulentas. Para bloquear as cepas muito virulentas, as vacinas *intermediate plus* ou *hot* foram desenvolvidas. Efeitos adversos das vacinas vivas levam à imunossupressão, pois induzem lesões moderadas a severas na bursa. A maior ou menor carga antigênica depende da patogenicidade da cepa vacinal (EIDSON et al., 1980; MÜLLER et al., 2012; TSUKAMOTO et al., 2013; GEERLIGS et al., 2015).

As vacinas inativadas são formuladas com adjuvantes oleosos, combinando cepas clássicas e variantes. Apresentam alto conteúdo de antígenos para induzir níveis elevados, duradouros e uniformes de anticorpos em aves reprodutoras, os quais são transferidos à progênie (MAAS et al., 2001; MÜLLER et al., 2012; PARKER; DE WIT, 2014).

Vacinas recombinantes são baseadas na expressão da proteína VP2 em diferentes sistemas eucariotos: leveduras e células de insetos. Ao contrário da imunização com vírus vivos e inativados, esta vacina induz apenas a resposta imune anti-VP2, mas não a anti-VP3. O desenvolvimento de testes sorológicos específicos para anticorpos contra VP2 e VP3 combinados com a vacina recombinante permite a implantação da estratégia DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) para diferenciar animais infectados de vacinais (RONG et al., 2005; MÜLLER et al., 2012).

As vacinas imuno-complexas são um novo conceito de vacinas e consistem na mistura de anticorpos específicos resultantes de soros hiperimunes de aves expostas ao vírus vacinal (IGNJATOVIC et al., 2006). Em geral, são injetadas *in ovo* ou administradas em aves com 1 dia de idade e é efetiva na presença de diferentes níveis de anticorpos maternos, o que resolve a questão da uniformidade dos anticorpos maternos (HADDAD et al., 1997; IVÁN et al., 2005; MÜLLER et al., 2012).

## 2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial do IBDV identifica o agente ou os anticorpos utilizando técnicas imunológicas ou moleculares. Várias técnicas estão disponíveis e sua aplicação depende do propósito do estudo. Os testes de isolamento e identificação do agente são precisos, mas não são possíveis aplicá-los em testes de rotina. Testes diagnósticos utilizados em rotinas laboratoriais para avaliar o *status* de imunização pós-vacinal de animais são baseados na detecção da resposta imune, principalmente utilizando a técnica de ELISA (OIE, 2016).

Os testes ELISA são comuns pois são mais econômicos, sensíveis, específicos, reproduzíveis, exatos e rápidos. Muitas empresas disponibilizam kits comerciais para detectar anticorpos em amostras de soro (Idexx, Hipra, Biovet). Diferentes formatos do teste ELISA *in house* têm sido desenvolvidos como o ELISA sanduíche, e o ELISA indireto utilizando como substrato antigênico o próprio agente etiológico ou, como alternativa, peptídeos sintéticos, anticorpos recombinantes e as proteínas antigênicas VP2 e VP3 recombinantes (CARDOSO et al., 1998; SARAVANAN et al., 2004; SAPATS et al., 2005; DEY et al., 2009). Proteínas recombinantes constituem uma alternativa mais barata e segura na produção de antígenos para testes diagnósticos, pois elimina a necessidade de cultivar o vírus em tecidos ou células animais em condições de segurança laboratorial. Os testes que utilizam como antígenos as proteínas recombinantes VP2 e VP3 são expressas em *E. coli* e células de insetos. A especificidade e sensibilidade obtidas são aceitáveis quando comparadas com testes ELISA comerciais, imunodifusão em gel de ágar e vírus neutralização (WANG et al., 2008; SINGH et al., 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver proteínas recombinantes para serem utilizadas em testes diagnósticos para a doença infecciosa da bursa e mapear as suas regiões antigênicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar as proteínas e regiões proteicas antigênicas potenciais para produção de antígenos recombinantes.
2. Clonar as sequências nucleotídicas nos vetores de expressão pET28a para *E. coli* e pMIB/V5-His para células de insetos.
3. Expressar as proteínas recombinantes em diferentes sistemas: *E. coli* e células de insetos e obter frações com bom grau de pureza.
4. Avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes frente a soros de animais vacinados e não vacinados.
5. Mapear as regiões antigênicas da proteína VP3.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E PROTEICAS

As sequências proteicas foram selecionadas no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências das proteínas VP2 e VP3 foram alinhadas utilizando a ferramenta de alinhamento múltiplo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) em busca de similaridades. As regiões variáveis das sequências da proteína VP2 foram agrupadas e comparadas para selecionar as sequências para síntese.

### 4.2 GENES SINTÉTICOS

As sequências gênicas foram obtidas do banco de nucleotídeos do NCBI e para uma proteína, a sequência nucleotídica foi reversamente traduzida utilizando o programa *Reverse Translate* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)). As sequências nucleotídicas foram sintetizadas e clonadas no vetor pUC57 pela empresa GenScript (New Jersey, Estados Unidos). Os códons dos genes foram alterados, visando adequar o *codon usage*, conteúdo GC, estrutura secundária do RNA entre outros parâmetros, para melhorar os níveis de expressão em diferentes sistemas: *E. coli* e células de inseto. Esta otimização foi realizada pela empresa contratada usando um *software* próprio. Os sítios das enzimas de restrição foram acrescentados a montante e a jusante das proteínas: *Bam*HI e *Xho*I nos genes para expressão em bactérias, e *Sph*I e *Xba*I nos genes para expressão em células de insetos.

### 4.3 *Escherichia coli* e CÉLULAS DE INSETOS

*E. coli* genótipo DH5 $\alpha$  TM: F- recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1, armazenadas a -80° C (Thermoscientific).

*E. coli* genótipo BL21 Star (DE3): F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), armazenadas a -80 °C (Novagen).

*E. coli* genótipo SHuffle: F' *lac*, *pro*, *lacI<sup>Q</sup>* /  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1*  $\Delta$ (*phoA*)*PvuII phoR ahpC\* galE* (or *U*) *galK latt::pNEB3-r1-cDsbC* (Spec<sup>R</sup>, *lacI<sup>Q</sup>*)  $\Delta$ *trxB rpsL150*(Str<sup>R</sup>)  $\Delta$ *gor*  $\Delta$ (*malF*)3, armazenadas a -80° C (New England Biolabs).

*E. coli* genótipo Tuner (DE3) pLysS: F– *ompT hsdSB(rB– mB–)* *gal dcm lacY1* (DE3) pLysS (CamR), armazenadas a -80 °C (Novagen).

*E. coli* genótipo Rosetta gami 2 (DE)3: *ara-leu7697*  $\Delta$  *lacX74*  $\Delta$  *phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac+(lacI<sup>Q</sup>)pro*] *gor522 ::Tn10* (TcR)*trxB::kan* (DE3) pRARE6 (CmR), armazenadas a -80 °C (Novagen).

Células de *Spodoptera frugiperda* linhagem Sf21 (Invitrogen).

#### 4.4 REAGENTES, SOLUÇÕES E MEIOS

- Água ultra pura, resistividade elétrica 18.2 MΩ-cm (megaohm/cm).
- Anticorpo monoclonal anti-poli-histidina produzido em camundongo (Sigma): TBS - tween 20 0,1% ou PBS - tween 20 0,05% - leite desnatado 1%.
- Anticorpo IgG anti-galinha conjugado com fosfatase (Sigma): diluído em PBS - tween 20 0,05% - leite desnatado 1%.
- Anticorpo IgG anti-galinha conjugado com peroxidase (Sigma): diluído em TBS - tween 20 0,1% ou PBS - tween 20 0,05% - leite desnatado 1%.
- Anticorpo IgG anti-*mouse* conjugado com fosfatase (Sigma): diluído em PBS - tween 20 0,05% - leite desnatado 1%.
- Anticorpo IgG anti-*mouse* conjugado com peroxidase (Sigma): diluído em TBS - tween 20 0,1% ou PBS - tween 20 0,05% - leite desnatado 1%.
- Brometo de etídio 0,5 µg/mL.
- *Cellfectin II* Reagent (Invitrogen): reagente lipídico-catiônico para transfecção em células de inseto.
- Enzimas de restrição (New England Biolabs).
- Filmes para revelação por quimioluminescência: Hyperfilm ECL (Amersham).
- Fosfatase FastAP (Thermoscientific).
- FSB (*Frozen storage buffer*): 10 mM acetato de potássio 1M pH 7,5 - 45 mM cloreto de manganês tetrahidratado - 10 mM cloreto de cálcio dihidratado - 100 mM cloreto de potássio - 3 mM cloreto de hexaminocobalto III - 10% glicerol, pH 6,4.
- Gel de agarose: 1g de agarose – 100 mL tampão TBE.

- Gel de poliacrilamida para eletroforese com SDS (13 e 15 %): solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 33,9%:2,65% - tris-HCl 400 mM pH 8,8 - SDS 0,1% - persulfato de amônio 0,075% -TEMED 0,07%.
- Gel *stacking*: solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 33,9%:2,65% - tris-HCl 120 mM pH 6,8 - SDS 0,1% - persulfato de amônio 0,075% -TEMED 0,07%.
- Kit substrato *ELC para western blot: Supersignal West Pico Mouse IgG Detection Kit* (Thermoscientific).
- LB (*Luria Bertani*): triptona 10 g/L - extrato de levedura 5 g/L - NaCl 5 g/L.
- LB-ágar: ao LB adicionou-se 1,5% de agar-ágar.
- Marcador de peso molecular 1Kb plus Gibco, 1Kb Promega, 1 Kb Invitrogen.
- Meio Sf-900 III SFM (Gibco) para cultivo de células de insetos.
- Meio SOB: triptona 20g/L – extrato de levedura 5 g/L - NaCl 5 M 2 mL/L – KCl 0,5 M 5 mL/L – MgCl<sub>2</sub> 1 M 10 mL/L – MgSO<sub>4</sub> 1 M 10 mL/L - pH 6,8 a 7,0.
- Meio SOC: triptona 20g/L – extrato de levedura 5 g/L - NaCl 5 M 2 mL/L – KCl 0,5 M 5 mL/L – MgCl<sub>2</sub> 1 M 10 mL/L – MgSO<sub>4</sub> 1 M 10 mL/L - pH 6,8 a 7,0 – glicose 20mM
- Membrana de nitrocelulose para *western blot* e *slot blot* (GE).
- Placas para ELISA, em poliestireno (Sarstedt).
- *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen).
- Reagentes para revelação por fosfatase alcalina, NBT e BCIT (Promega).
- Resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) para purificação de proteínas (Qiagen).
- Solução de azul de Coomassie: azul de Coomassie R-250 0,1% - metanol 45% - ácido acético 10%.
- Solução de bloqueio para *slot blot*: TBS - tween 20 0,1% - leite em pó desnatado 5%.
- Solução de bloqueio para *western blot* e teste de ELISA: PBS - tween 20 0,05% - leite em pó desnatado 5%.
- Solução de lavagem para *slot blot*: TBS - tween 20 0,1%.
- Solução de lavagem para *western blot* e teste de ELISA: PBS - tween 20 0,05%.
- Solução de Ponceau S: Ponceau S (Sigma) 0,5% - ácido acético glacial 1%.
- Solução estoque de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP e dTTP diluídos em tris-HCl 10 mM pH 7,5 concentração de 2,5 mM de cada nucleotídeo.
- Solução para descoloração de géis de proteína: metanol 4% - ácido acético 7,5%.

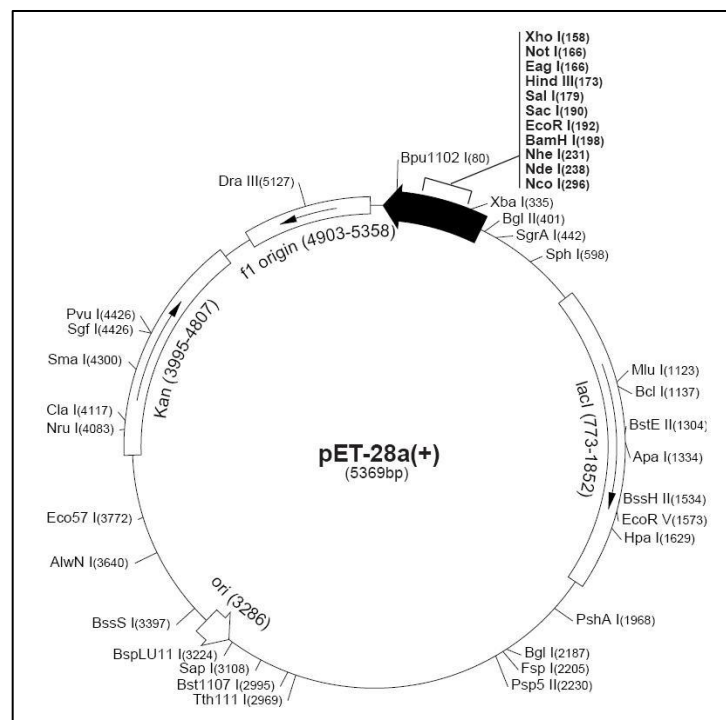
- Substrato da enzima fosfatase para teste de ELISA: solução líquida de paranitrofenil fosfato – pNPP (Sigma)
- Substrato da enzima peroxidase para teste de ELISA: tetrametilbenzidina – TMB (KPL).
- T4 DNA Ligase (Invitrogen).
- Tampão de amostra para SDS-PAGE 4X: tris-HCl 125 mM pH 5,8 - SDS 2% -mercaptoetanol 5% - glicerol 12% - azul de bromofenol 0,012%.
- Tampão de corrida SDS - PAGE: tris 255 mM - glicina 192 mM - SDS 1%.
- Tampão de eluição: tris HCl pH 8,0 50 mM - NaCl 300 mM - PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) 0,5 mM – glicerol 10% - 100 a 500 mM de imidazol, adicionado ou não de 2 M de ureia.
- Tampão de lavagem A para desnaturação com ureia: tris HCl pH 8,0 50 mM - NaCl 300 mM - PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) 0,5 mM – glicerol 10% - 5 mM de imidazol – triton 2% -  $\beta$ mercaptoetanol 10mM –EDTA 5 mM.
- Tampão de lavagem A para purificação com resina de níquel: tris HCl pH 8,0 50 mM - NaCl 300 mM - PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) 0,5 mM – glicerol 10% - 5mM de imidazol, adicionado ou não de 2 M de ureia.
- Tampão de lavagem B para desnaturação com ureia: tris HCl pH 8,0 50 mM - NaCl 300 mM - PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) 0,5 mM – glicerol 10% - 5 mM de imidazol – triton 2% -  $\beta$ mercaptoetanol 10 mM –EDTA 5 mM – ureia 1M.
- Tampão de lise para *toothpick*: NaOH 50 mM - glicerol 5% - SDS 0,5% - EDTA 5 mM - água ultra-pura q.s.p. 1 ml - 1,5 mg azul de bromofenol.
- Tampão de lise: tris HCl pH 8,0 50 mM - NaCl 300 mM - PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) 0,5 mM – glicerol 10% - 5 mM de imidazol.
- Tampão de revelação para fosfatase alcalina (*AP-buffer*): tris-HCl 100 mM pH9,5 - NaCl 100 mM -  $MgCl_2$  5 mM - NBT (cloreto de nitro-blue tetrazolium) 0,66% - BCIT (sal de 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato p-toluidina) 0,33%.
- Tampão de sensibilização carbonato:bicarbonato ( $Na_2CO_3$  -  $NaHCO_3$ ) 100 mM pH 9,6: adicionado ou não de 2 M de ureia.
- Tampão de solubilização: tris HCl pH 8,0 50 mM - NaCl 300 mM - PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) 0,5 mM – glicerol 10% - 5mM de imidazol – tween 20 1% -  $\beta$ mercaptoetanol 20mM – imidazol 5mM – ureia 2M a 8M.
- Tampão de transferência para *western blot*: tris base 25 mM - glicina 192 mM - metanol 20%.

- Taq DNA polimerase (IBMP)
- TBE: tris pH 7,6 89 mM - ácido bórico 89 mM - EDTA 2 mM pH 8,3.
- Teste Comercial ELISA IBD/Ab (Idexx): placas sensibilizadas com antígeno do IBD inativado.

#### 4.5 VETORES

Vetor pET-28a (Novagen): para expressão em bactérias, com gene de resistência para canamicina (FIGURA 5).

FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a. 5369 NUCLEOTÍDEOS. PROMOTOR T7: BASES 370-386. ÍNICIO DA TRANSCRIÇÃO T7: BASE 369. SEQUÊNCIA CODIFICADORA HIS-TAG: BASES 270-287. SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA T7-TAG: BASES 207-239. REGIÃO MÚLTIPLA DE CLONAGEM (*Bam*HI – *Xho*I): BASES 158-203. SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA HIS-TAG: BASES 140-157. TERMINADOR T7: BASES 26-72. SEQUÊNCIA CODIFICADORA LACL: BASES 773-1852 ORIGEM PBR322: BASE 3286. GENE DE RESISTÊNCIA A CANAMICINA (KAN): BASES 3995-4807. ORIGEM F1: BASES 4903-5358.

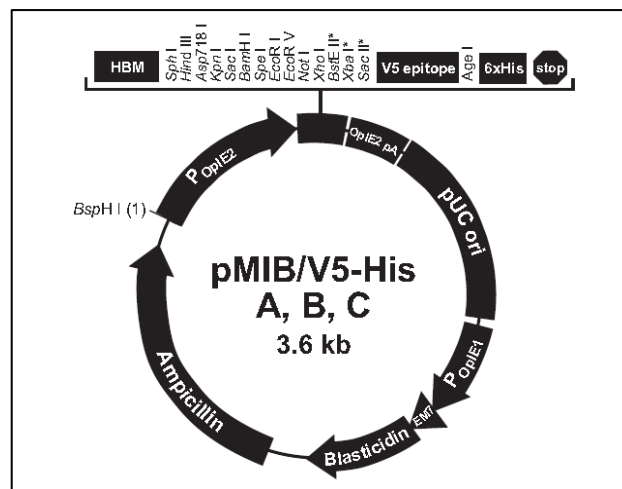


FONTE: (NOVAGEN, 2016a).



Vetor pMIB/V5-His (Invitrogen): para expressão em células de inseto, com gene de resistência para ampicilina (FIGURA 6).

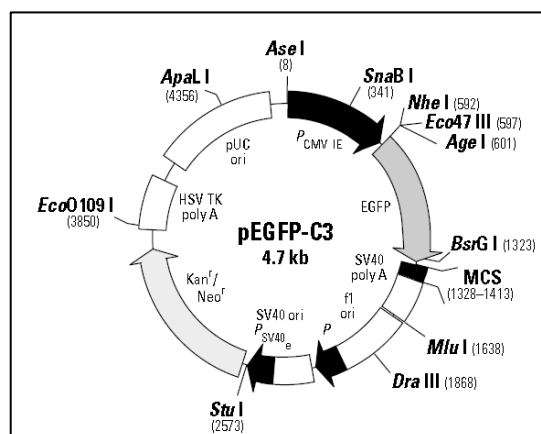
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR DE EXPRESSÃO pMIB/V5-His. 3596 NUCLEOTÍDEOS. POPIE2: PROMOTOR, BASES 1-549. OPIE2 PA: SÍTIO DO INICIADOR, BASES 511-530. HSM: SINAL DE SECREÇÃO DA MELITINA DE ABELHA, BASES 565-627. REGIÃO MÚLTIPLA DE CLONAGEM: BASES 629-721. V5 EPIPOPO: BASES 734-775. 6XHIS: REGIÃO DE POLIHISTIDINA, BASES 785-802. PUCORI: ORIGEM, BASES 1018-1691. P OPIE1: PROMOTOR, BASES 1765-2056. EM7: PROMOTOR, BASES 2056-2122. BLASTICIDIN: GENE DE RESISTÊNCIA À BLASTICIDINA, BASES 2123-2521. AMPICILIN: GENE DE RESISTÊNCIA À AMPICILINA, BASES 2641-3501.



FONTE: (INVITROGEN, 2016a).

Vetor pGFP-C3 (Clontech): com gene de resistência para canamicina (FIGURA 7).

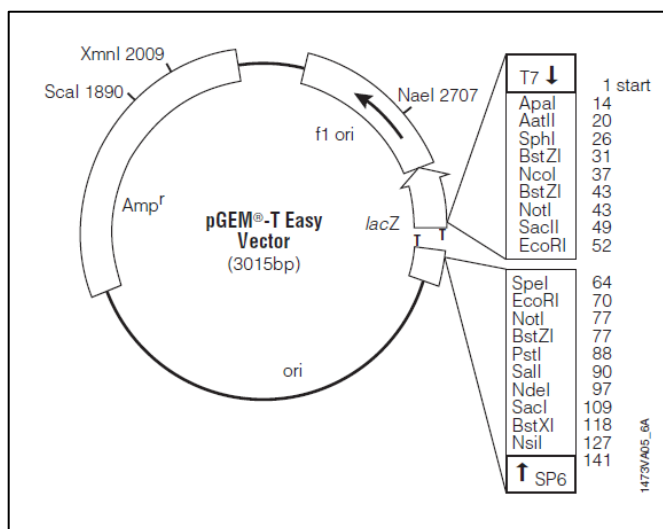
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR pEGFP-C3. HUMAN CYTOMEGALOVÍRUS (CMV) IMMEDIATE EARLY PROMOTER: 1-589. GENE DA GFP: BASES 606-1329. REGIÃO MÚLTIPLA DE CLONAGEM (MCS): BASES 1328-1413. SINAL DE POLIADENILAÇÃO AO PROMOTOR SV40: BASES 1546-2098. GENE DE RESISTÊNCIA A CANAMICINA/NEOMICINA (KAN/NEO): BASES 2623-3417. SINAL DE POLIADENILAÇÃO DO VÍRUS HERPES SIMPLEX: BASES 3653-3671. ORIGEM DE REPLICAÇÃO pUC: 4002-4645



FONTE: (BD BIOSCIENCES CLONTECH, 2016)

Vetor pGEM-T Easy (Promega): com gene de resistência para ampicilina (FIGURA 8).

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR pGEM-T Easy. T7: REGIÃO DE INICIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO POR T7 RNA POLIMERASE. REGIÃO MÚLTIPLA DE CLONAGEM: BASES 10-113. PROMOTOR DA SP6 RNA POLIMERASE. LACZ: CÓDON INICIAL DE LACZ. AMP<sup>r</sup>: GENE DE RESISTÊNCIA À AMPICILINA. F1 ORI: ORIGEM DE REPLICAÇÃO.



FONTE: (PROMEGA, 2016)

#### 4.6 PREPARO DE CÉLULAS CÁLCIO COMPETENTES

As cepas das bactérias *E. coli* foram preparadas seguindo o protocolo modificado descrito por (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). No fluxo laminar, uma alíquota da célula mantida em meio com glicerol a -80 °C foi plaqueada, em meio LB-ágar e incubada a 37 °C, por 16 a 18 horas. Quatro a cinco colônias foram inoculadas em 5mL de meio SOBm e mantida a 37 °C, por 16 a 18 horas, sob agitação constante de 200 rpm. Um volume de 1 mL da cultura foi transferido para 100 mL de meio SOBm, incubada a 37 °C, sob agitação a 200 rpm até que a fase exponencial medida pela densidade ótica (D.O.) em 600 nm atingisse 0,3 a 0,5. A cultura foi transferida para tubo de centrifuga, mantida em gelo por 10 minutos e centrifugada a 2700 x g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 40 mL de tampão FSB resfriado e incubado em gelo por 10 minutos. A centrifugação foi repetida e o *pellet* foi novamente ressuspensão em 2 mL de tampão FSB resfriado. Uma alíquota de 70 µL de DMSO estéril foi adicionada, a suspensão foi gentilmente homogeneizada

e incubada em gelo por 15 minutos. Mais uma alíquota de 70 µL de DMSO foi adicionada e as células foram rapidamente aliquotadas em tubos de microcentrífuga resfriados. Após 1 a 2 horas de incubação no gelo, os tubos foram armazenados a -80 °C.

#### **4.7 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* CÁLCIO COMPETENTE**

Uma alíquota de 50 ou 100 µL de células de *E. coli* DH5α cálcio competentes foi descongelada em gelo por 10 minutos. Em bancada, um volume contendo 70 a 100 ng do plasmídeo foi adicionado à alíquota e o tubo foi incubado em gelo, por 30 minutos. A seguir, a reação foi submetida ao choque térmico a 42 °C, por exatamente 2 minutos e novamente incubada em gelo, por mais 2 minutos. Foram adicionados 900 a 950 µL de meio LB ao tubo e a reação foi incubada a 37 °C, durante 1 a 1,5 horas, a 200 rpm. No fluxo laminar, 50 a 200 µL da solução foram espalhados com o auxílio da alça de Drygowski em placa de Petri contendo meio LB-ágar suplementado com o antibiótico apropriado. A placa foi incubada a 37 °C, por 16 a 18 horas, para a obtenção de colônias.

#### **4.8 PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL**

Colônias plaqueadas foram selecionadas utilizando ponteira e inoculadas (pré-inóculo) em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB acrescido de canamicina (50 µg/mL) ou ampicilina (100 µg/mL), incubados a 37 °C, sob agitação a 200 rpm, por 16 a 18 horas. A purificação do DNA plasmidial de pequenos volumes foi realizada com o Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ou QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ou NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey Nagel), segundo as recomendações dos fabricantes. Para purificação de volumes maiores de plasmídeos, o pré-inóculo (5 mL) foi transferido para um erlenmeyer com 200 mL de meio LB (inóculo) com o antibiótico apropriado, incubado a 37 °C, sob agitação a 200 rpm, por 16 a 18 horas. A purificação do DNA plasmidial de volumes maiores foi realizada com o Plasmid Midiprep Kit (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi quantificado através da medição de absorbância no aparelho Nanodrop ND-1000.

#### 4.9 AMPLIFICAÇÃO POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

As amplificações foram realizadas com a enzima Taq polimerase (IBMP-Curitiba-PR) para amplificar o DNA plasmidial e confirmar a presença de clones recombinantes. Os insertos, que tiveram como molde o pUC57, foram amplificados com a enzima *hot-start* Taq polimerase Platinum da marca Invitrogen. Essa enzima é ativada a 94 °C, durante o início da PCR, aumentando a especificidade da reação. Diferentes temperaturas de anelamento foram testadas: 50, 55, 60 e 65 °C. A mistura para a reação de PCR consistiu de: 1X de tampão Taq polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 0,06 a 1 U de Taq polimerase, 0,01 a 1 ng do molde de DNA genômico em volumes finais de 25 ou 50 µL. As condições da amplificação foram: 5 minutos a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50, 55, 60 ou 65 °C, 30 segundos a 72 °C e uma etapa final de 7 minutos a 72 °C. As reações foram incubadas nos termocicladores da Perkin-Elmer 9700 ou MWG da Biotech. Os produtos da amplificação foram verificados em gel de eletroforese 1%.

Os iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) para as reações de PCR dos insertos foram desenhados com base na sequência de cada gene (Quadro 01). Os sítios das endonucleases, conforme descrito no item 4.2, foram acrescentados nas extremidades 5' dos oligonucleotídeos, além da sequência gênica do sítio de reconhecimento da protease do vírus TEV, da cauda de histidina e dos códons de parada. Para a amplificação dos vetores foram utilizados os iniciadores F e R baseados nas regiões dos promotores e terminadores.

#### 4.10 ELETROFORESE DE DNA

O DNA amplificado por PCR e o DNA plasmidial foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% ou 1%, imerso em tampão TBE 0,5X para verificar o padrão de bandas obtido. O marcador de peso molecular foi aplicado no gel com o DNA homogeneizado em mistura de glicerol e corantes. Na eletroforese foi aplicada a potência de 90-100V. O gel foi submerso em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL por 15 a 30 minutos para corar o DNA e lavado, em seguida, com água destilada. O gel foi visualizado em transiluminador com comprimento de onda ultravioleta (260 nm) e fotografado no sistema de fotodocumentação (L-PIX, Loccus Biotecnologia).

QUADRO 1: SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AS AMPLIFICAÇÕES E CLONAGENS

Identificação	Sequência
DPP_IBV1_VP2_EC_F	CCCGGATCCGAAAATCTGTACTTCCAGGGTATGACCAATCTGCAAGACCAA
DPP_IBV2_VP2_EC_F	CCCGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAAGGCATGACCAACCTGCAAGACCAG
DPP_IBV3_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGTATACCATTACGGCAGCG
DPP_IBV4_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGACGGCGGCAGACGATTAT
DPP_IBV5_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGTCTGACCGTCCGCGTGTC
DPP_IBV6_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGTCGGCTACGGCTAATATC
DPP_IBV7_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGGACGACTACCAGTTCAGT
DPP_IBV8_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGACCATTACGCTGTTCTCG
DPP_IBV9_VP2_EC_F	CCCGAATTCATGACCATTACCCTGTTCTCG
DPP_IBV1_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTAGCGCAGTGCACGGATAAT
DPP_IBV2_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTAGCGGATTGCACGGATAAT
DPP_IBV3_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTACAGGGTAACCGGACGCAG
DPP_IBV4_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTAGGCAACCAGGGTCACCGG
DPP_IBV5_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTAGGTAACCGGACGCAGTGC
DPP_IBV6_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTACGGATTCCGAATCAGTTC
DPP_IBV7_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTACAGGGTAACCGGACGCAG
DPP_IBV8_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTACGTGATCGGCTGGGTAAT
DPP_IBV9_VP2_EC_R	CCCCTCGAGTTAGGTGATCGGCTGCGTAAT
DPP_IBV1_VP3_EC_INTF	CCCGGATCCGAAAATCTGTACTTCCAAGGCATGTTTCCGCATAACCCGCGT
DPP_IBV1_VP3_EC_F1F	CCCGAATTCATGTTTCCGCATAACCCGCGT
DPP_IBV1_VP3_EC_F2F	CCCGAATTCCCGGAACTGGAATCTGCCGTC
DPP_IBV1_VP3_EC_F3F	CCCGAATTCAACTTTGCGCTGTTCGACCCG
DPP_IBV1_VP3_EC_F4F	CCCGAATTCCGTGGTCCGACCCCGGAAGAA
DPP_IBV1_VP3_EC_F5F	CCCGAATTCCCGTCCCCGGGTCAGCTGAAG
DPP_IBV1_VP3_EC_F6F	CCCGAATTCCGTGCCGCAACGAGTATCTAT
DPP_IBV1_VP3_EC_F7F	CCCGAATTCAAGGACCTGCTGCTGACCGCT
DPP_IBV1_VP3_EC_INTR	CCCCTCGAGTTATTCCAGGTCTTCATCAGA
DPP_IBV1_VP3_EC_F1R	CCCCTCGAGTTACATTGCACGGACGGCAGA
DPP_IBV1_VP3_EC_F2R	CCCCTCGAGTTAATGTGCATTGCGGTCCGA
DPP_IBV1_VP3_EC_F3R	CCCCTCGAGTTAGCGCTGTGCTTCTCCGG
DPP_IBV1_VP3_EC_F4R	CCCCTCGAGTTATTGCCAGTACTTCAGCTG
DPP_IBV1_VP3_EC_F5R	CCCCTCGAGTTACGGTGCACCATAGATACT
DPP_IBV1_VP3_EC_F6R	CCCCTCGAGTTACATTTCCATAGCGGTCAG
DPP_IBV1_VP3_EC_F7R	CCCCTCGAGTTATTCCAGGTCTTCATCAGA
DPP_IBV1_VP2_IN F	CCCGCATGCCAAACCTCCAAGACCAGACACAA
DPP_IBV2_VP2_IN F	CCCGCATGCCAAACCTCCAAGACCAAACCTCAA
DPP_IBV3_VP2_IN F	CCCGGTACCAACCATCACCGCTGCTGAC
DPP_IBV4_VP2_IN F	CCCGGTACCAGCTGCTGACGACTACCAA
DPP_IBV5_VP2_IN F	CCCGGTACCAGACCGTCCAGAGTCTAC
DPP_IBV6_VP2_IN F	CCCGGTACCAGCTACAGCCAACATCAACG
DPP_IBV7_VP2_IN F	CCCGGTACCAGACTACCAGTTCTTCTCAATAC
DPP_IBV8_VP2_IN F	CCCGGTACCAATCACTCTTCTCCGCT
DPP_IBV9_VP2_IN F	CCCGGTACCAATCACTCTTCTCTGCTAAC
DPP_IN_XbaStopHis_R	CCCTCTAGATCATTCATTCAAGTGGTGGTGG
DPP_pET28a_F	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAG
DPP_pET28a_R	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG
DPP_pMIB_OpIE2_F	CGCAACGATCTGGTAAACAC
DPP_pMIB_OpIE2_R	CTGACTAAATCTTAGTTTGTATTGTC
DPP_GFP_Sph_F	CCCGCATGCAGATGGTGAGCAAGGGCGAG
DPP_GFP_TEV_Sph-R	CCCGCATGCCGCCCTGAAAATACAGGTTTCTTGTACAGCTCGTCCATG

#### 4.11 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Após a amplificação por PCR os produtos foram purificados para eliminação de iniciadores, enzimas e sais da reação de PCR. Foram utilizados os sistemas da QIAGEN QIAquick PCR Purification ou MinElute PCR Purification, seguindo os protocolos do fabricante. O DNA purificado foi quantificado através da medição de absorvância no aparelho Nanodrop ND-1000.

#### 4.12 REAÇÃO DE DIGESTÃO

Os vetores de expressão e os insertos foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Sph*I, *Eco*RI, *Xho*I, *Kpn*I, *Xba*I (2U), tampões NEB2, NEB3, NEB4 e tampão *Eco*RI (1X) e BSA (quando necessário) a 37 °C, por 4 a 16 horas, seguido ou não de inativação da enzima a 65 ou 80 °C.

#### 4.13 REAÇÃO DE DESFOSFORILAÇÃO

O pET-28a e o pMIB/V5-His foram desfosforilados com a fosfatase FastAP (2U) e tampão 10X a 37 °C por 20 minutos. A enzima foi inativada a 75 °C por 2 minutos. O DNA foi purificado com 2 µL de acetato de sódio 3M pH 6,0 (1/10 do volume da reação), 66 µL de etanol 95% (3X volume da reação). Esta reação foi incubada no gelo por 30 minutos. A seguir, foi centrifugada à rotação de 4300 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 17900 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado. O sedimento foi incubado por 5 minutos em banho seco a 37 °C e ressuspenso em 20 µL de água ultrapura e novamente incubado a 37 °C por 10 minutos.

#### 4.14 REAÇÃO DE LIGAÇÃO

As ligações dos insertos aos vetores de expressão foram feitas nas proporções 3:1 ou 10:1 inserto:vetor (razão molar). As reações, especificadas abaixo, foram incubadas a 16° C durante ~20 horas.

QUADRO 2. REAÇÃO DE LIGAÇÃO

Reagentes	Quantidades
inserto	20 a 100 ng
vetor	50 a 200 ng
Tampão T4 DNA ligase (5X)	2 $\mu$ L
T4 DNA Ligase (1U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Água ultra pura	q.s.p.
Volume final	10 $\mu$ L

## 4.15 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

### 4.15.1 Técnica de Palitagem (*toothpick*)

Colônias de bactérias recombinantes foram coletadas das placas com o auxílio de palitos de dente estéreis e transferidas para placa de Petri com meio LB-ágar com o antibiótico apropriado (placa-mãe). Concomitantemente, as colônias foram transferidas para o fundo dos poços de uma placa de PCR. A cada poço foram acrescentados 15  $\mu$ L de tampão de lise. A placa foi levemente agitada e incubada a 65 °C por 10 minutos para lise das bactérias. As amostras foram aplicadas em gel de eletroforese 1% conforme descrito no item 4.10. Como controle foi utilizado o vetor de expressão sem o inserto.

### 4.15.2 PCR de colônia

As colônias recombinantes foram transferidas para o fundo dos poços de uma placa de PCR e adicionados os reagentes de PCR: tampão Taq polimerase 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador, 0,06 U/ $\mu$ L de Taq polimerase (IBMP). Os iniciadores F do vetor e o R do inserto foram utilizados para verificar a presença dos insertos na orientação correta. As condições da amplificação foram: uma etapa de desnaturação de 5 minutos a 94° C seguida de 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 58 °C (anelamento) e 1 minuto a 72 °C (extensão), seguidos de 7 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de eletroforese 1%. Como controle foram utilizados os vetores de expressão sem inserto.

#### 4.16 SEQUENCIAMENTO

Os clones selecionados foram sequenciados para a verificação da ligação em fase dos insertos aos vetores. Foram utilizados como iniciadores F e R as sequências dos promotores e terminadores dos vetores de expressão. O sequenciamento foi realizado pela empresa MacroGen (Seoul, Korea). Os resultados foram analisados através do programa *Blast* ( <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 4.17 TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM *E. coli*

Células competentes das linhagem de *E. coli* BL21 Star, Shuffle ou Tuner pLysS e Rosetta gami 2 foram transformadas com clones recombinantes, por choque térmico, após confirmação por sequenciamento. A transformação foi realizada conforme protocolo descrito no item 4.7. Uma colônia plaqueada foi inoculada (pré-inóculo) em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB ou SOC acrescido do antibiótico apropriado e incubado a 30 °C ou 37 °C, sob agitação a 200 rpm, por 16 a 18 horas. Inóculos de 5 mL, 20 mL, 100 mL ou 500 mL contendo 1% do pré-inóculo anterior e antibiótico apropriado foram incubados a 30 °C ou 37 °C, conforme o experimento, sob agitação a 200 rpm, até a cultura atingir a densidade ótica de 0,4 a 0,8, a 600 nm. Foi separada uma alíquota de 1,5 mL da cultura como controle sem indução e, ao resto da cultura, foi adicionado IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tio-galactopiranosídeo) nas concentrações finais de 0,2 mM, 0,5 mM e 1 mM, conforme o experimento. A cultura foi incubada em diferentes tempos de 1 a 5 horas ou 16 a 18 horas e temperaturas de 15 °C, 20 °C, 28 °C, 30 °C e 37 °C ajustados para cada experimento, sob agitação de 200 rpm. Após o período de indução, a cultura e o controle foram centrifugados a 6000 xg, por 10 minutos, a 4 °C. A fração do sobrenadante foi descartada e o sedimento foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de tampão de lise ou 2 mL para cada grama de *pellet* (para volumes maiores de indução). Uma alíquota foi diluída em tampão de amostra para SDS-PAGE (4X) e incubada a 95 °C por 5 minutos. A expressão das proteínas foi verificada por SDS-PAGE através do padrão das bandas obtido pela migração das proteínas em gel de poliacrilamida 13 ou 15%, a 20 mA. O gel foi corado com azul de Coomassie e descorado com solução de descoloração.

O precipitado de células bacterianas ressuspensionado em tampão de lise foi incubado com 250 a 500  $\mu$ g/mL lisozima, sob agitação no gelo, por 1 hora. A seguir, as



células foram submetidas a 8 ciclos de sonicação de 3 segundos à amplitude 20%, com intervalo de 20 segundos entre cada ciclo. As células foram centrifugadas a 20000 xg, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante constitui a fração solúvel. O *pellet*, contendo os corpos de inclusão, foi ressuspendido em tampão de lise. Uma alíquota de cada tubo foi coletada e analisada por SDS-PAGE, conforme procedimento descrito anteriormente, para verificar o padrão das bandas obtidas.

#### 4.18 SOLUBILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS INSOLÚVEIS

As proteínas insolúveis em corpos de inclusão foram desnaturadas antes da purificação. O *pellet*, contendo a proteína insolúvel em corpos de inclusão, ressuspendido em tampão de lise (item 4.17), foi mais uma vez sonicado, no gelo, 6 pulsos de 7 segundos com intervalos de 30 segundo na amplitude 20%. Em seguida, a solução foi centrifugada a 20000 x g, por 30 minutos, a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado três vezes com 1 a 2 mL tampão de lavagem A, sonicado e centrifugado como anteriormente. A seguir, o *pellet* foi lavado com 1 a 2 mL de tampão de lavagem B contendo 1 M de ureia, sonicado e centrifugado como anteriormente. O *pellet* foi ressuspendido em tampão de solubilização com concentrações de 2 a 8 M de ureia, para avaliar a melhor condição de desnaturação da proteína. A cada centrifugação alíquotas do lavado (sobrenadante) e do *pellet* foram recolhidas para análise por SDS-PAGE.

#### 4.19 PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL

Uma alíquota de 100 µL de resina foi pipetada em tubo de 1,5 mL e lavada com água ultra-pura. O tubo foi centrifugado a 500 xg por 1 minuto. A resina foi submetida a três lavagens com 1 mL de tampão A, centrifugada como anteriormente e o sobrenadante foi descartado. Uma alíquota de 1 mL da fração solúvel da proteína obtida conforme item 4.17 foi acrescentada à resina, incubada, no gelo, sob agitação durante 2 horas e centrifugada como anteriormente. O *pellet* contendo a resina e a proteína ligada foi lavado em 1 mL de tampão A, incubado, no gelo, sob agitação durante 5 minutos e centrifugado como anteriormente. O procedimento de lavagem foi repetido quatro vezes. A lavagem foi testada com tampões contendo concentrações de 5 a 80 mM de imidazol. Para eluir a proteína da resina, o *pellet* foi ressuspendido

em 200  $\mu$ L de tampão B contendo imidazol, foi incubado no gelo sob agitação durante 20 minutos e centrifugado como anteriormente. O *pellet* foi novamente ressuscitado em 100  $\mu$ L de tampão B contendo imidazol. Para avaliar a concentração mais eficiente de imidazol diferentes concentrações foram testadas: 100 mM, 250 mM e 500 mM. A proteína desnaturada com ureia foi submetida à purificação como descrito acima, exceto que aos tampões utilizados foi adicionado ureia. Em todas as etapas foram recolhidas alíquotas do sobrenadante para análise por SDS-PAGE para verificação da eficiência da purificação.

#### 4.20 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas por SDS-PAGE por leitura visual com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). Soluções seriadas de 0,1 a 3,0 mg/mL de BSA diluídas em tampão de amostra para SDS-PAGE (4X) foram incubadas a 95 °C por 5 minutos. Alíquotas das soluções seriadas foram aplicadas junto com as amostras e migradas por SDS-PAGE. Alternativamente, as proteínas purificadas foram quantificadas por espectrofotometria, por medição da absorbância a 280nm no aparelho Nanodrop ND-1000.

#### 4.21 WESTERN BLOT

A confirmação das proteínas recombinantes foi realizada por *western blot*, com o anticorpo anti-histidina que reage com a cauda de 6 histidinas do vetor de expressão pET-28a e com as histidinas adicionadas aos genes sintéticos para expressão em células de insetos. As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45  $\mu$ m) em sistema de transferência semi-seco (Biorad), com tampão de transferência, por 60 minutos. A membrana foi corada com *Ponceau S* por 5 minutos, sob agitação, para sinalização do padrão de marcador de proteínas, seguida de descoloração com água destilada. A membrana foi incubada com solução de bloqueio por 18 horas a 8 °C, sob leve agitação. A seguir, foram realizadas três lavagens com solução de lavagem, por 5 minutos sob leve agitação. Na sequência, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-histidina (1:3000), por 1 hora sob leve agitação. Foram realizadas mais três lavagens como as anteriores

e a membrana foi novamente incubada com anticorpo secundário anti-mouse conjugado à fosfatase alcalina (1:10.000) por 1 hora, sob leve agitação. Por último, a membrana foi lavada três vezes como anteriormente. A reação enzimática foi revelada, no escuro, com tampão de revelação para fosfatase alcalina. Após o aparecimento das bandas, a membrana foi lavada com água destilada para parar a reação.

#### **4.22 SLOT BLOT REVELADO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

As proteínas foram adsorvidas em membrana de nitrocelulose através de um sistema de *manifold* a vácuo para *slot blot*. A membrana foi corada com *Ponceau S* por 5 minutos, sob agitação, para verificar a adsorção da proteína, seguida de descoloração com água destilada. Em seguida, foi recortada em tiras para incubação em canaletas. A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio por 18 horas, a 8 °C, sob leve agitação. Após o bloqueio, foi lavada 3 vezes com solução de lavagem por 5 minutos, sob leve agitação. A membrana foi incubada com os soros diluídos 1:5000 e anticorpo anti-his 1:10000 em TBS -Tween 0,1% (v/v) com 1% (m/v) de leite desnatado em pó, por 1 hora em temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada como anteriormente. A membrana foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente, sob leve agitação, com anticorpos anti-chicken conjugados com peroxidase diluído 1:40000 e anti-mouse conjugado com peroxidase diluído 1:7000. Após a incubação, a membrana foi lavada como anteriormente. A reação enzimática foi detectada por quimioluminescência com o *kit ECL Western Blotting*, de acordo com as instruções do fabricante. O sinal foi captado por filmes para revelação por quimioluminescência em diferentes tempos de exposição, ajustados para cada experimento, no escuro. A revelação foi realizada com solução reveladora por dois minutos, seguida de lavagem em água por dois minutos, fixação em solução fixadora por dois minutos e, por fim a última lavagem em água por dois minutos.

#### **4.23 TESTE DE ELISA INDIRETO**

Revelação com peroxidase: as placas foram sensibilizadas com 100 µL de proteína diluída em tampão carbonato-bicarbonato 100 mM pH 9,6 na concentração de 0,2, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL e incubadas por 16 a 18 horas, a 8 °C. A seguir, as placas foram lavadas, 4 vezes com tampão de lavagem e batidas na bancada para retirar o

excesso de tampão. As placas foram bloqueadas com solução de bloqueio e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas como anteriormente e incubadas com 100 µL de soro diluído 1:100 ou 1:500, em duplicata ou triplicata, por 1 hora, a 20 °C. As placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem. As placas foram incubadas com 100 µL de conjugado anti-chicken marcado com peroxidase (anticorpo secundário) nas diluições 1:10000, 1:20000 ou 1:40000 incubadas por 1 hora, a 20 °C. As placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem e incubadas com 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação entre o substrato TMB e peroxidase produz uma mudança de cor. A reação foi parada com 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A densidade ótica (D.O.) de cada poço foi lida a 450 nm.

Revelação com fosfatase: as placas foram sensibilizadas com 100 µL de antígeno a 1, 3, 5, 7, e 10 µg/mL, incubadas com soros diluídos 1:100 e 1:500 e conjugado anti-chicken marcado com fosfatase 1:40000. A revelação foi realizada com 50 µL de pNPP e a reação foi parada com NaOH 3 M.

As análises estatísticas dos resultados do teste de ELISA (médias, desvio padrão, coeficiente de variação) foram calculadas no programa Excel. A análise da curva ROC foi realizada no programa MedCalc.

#### 4.24 CULTIVO E TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS DE INSETOS

As células Sf21 foram cultivadas em 5 mL de meio SF-900 III, a 28 °C, em garrafas de cultura com capacidade de 15 cm<sup>3</sup>. O repique das células foi realizado no momento em que as células apresentavam-se confluentes. As células foram repicadas em placa de 6 poços na concentração de 5 x 10<sup>6</sup> em 2 mL de meio SF-900 III, por poço. A placa foi incubada a 28 °C por 40 minutos. Em tubo de 1,5 mL foram diluídos ~1 µg de plasmídeo e 100 µL de meio SF-900 III. Em outro tubo foram diluídos 6 µL do lipossoma *Cellfectin Reagent* e 100 µL de meio SF-900 III. Em seguida, a solução contendo *Cellfectin* foi misturada à solução contendo o plasmídeo. Um controle foi feito com o plasmídeo, sem o *Cellfectin*. A solução de transfecção foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação da placa, 1 mL do meio foi retirado de cada poço, com cuidado para não perturbar a monocamada de células. Todo o conteúdo da mistura foi aplicado por gotejamento no poço. A placa foi incubada a 28 °C por 4 horas, e agitada a cada meia hora. Após 24 horas, 20 mg/mL

do antibiótico blasticidina, para seleção das células transfectadas, foram acrescentados em cada poço, seguido por uma leve agitação da placa. Após 24 horas, as células foram desaderidas com auxílio da pipeta e 500 µL desta cultura foram transferidos para poços de outra placa contendo 4,5 mL do meio SF-900 III. A seleção foi finalizada com a morte das células do controle.

#### 4.25 SOROS

Os soros foram obtidos de animais de granja imunizados, vacinados ou com anticorpos maternos (com 1 dia de idade), de animais não vacinados e não confinados e de animais com *status* vacinal desconhecido. Os soros de aves de 1 dia de idade com anticorpos maternos foram gentilmente cedidos por uma granja comercial, Carambeí, PR. Os soros de animais confinados imunizados por vacinação foram cedidos gentilmente pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Curitiba, PR. Os soros de animais adultos não vacinados e não confinados foram gentilmente cedidos por um criador doméstico do bairro Santa Cândida, Curitiba, Paraná. Dois soros com *status* vacinal desconhecido foram gentilmente cedidos por um criador doméstico de Campo Largo, PR. Os soros negativos foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra Elizabeth Santin da UFPR, de animais *naive*, não expostos ao vírus. Não foram encontrados painéis sorológicos comerciais ou soros de referência. As amostras de soros foram testadas com o teste comercial Idexx IBD Ab Test®. Os soros negativos *naive* não foram testados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS

As proteínas do capsídeo do IBDV, VP2 e VP3, são antigênicas e indicadas para serem utilizadas em testes diagnósticos (SARAVANAN et al, 2004; SAPATS et al., 2005; WANG et al., 2008; SINGH et al., 2010). Para desenvolver os antígenos recombinantes e diagnosticar a variabilidade genética dos vírus da IBD no Brasil, sequências de nucleotídeos e de aminoácidos representantes da VP2 e VP3 foram pesquisadas no *GenBank*.

Da VP2 foram selecionadas 64 sequências completas e truncadas (com apenas a região variável da VP2 sequenciada) entre cepas vacinais (40) e de isolados selvagens brasileiros (24). As sequências de aminoácidos foram alinhadas através do programa *ClustalW* para alinhamentos de múltiplas sequências com o intuito de verificar o nível de similaridade entre as proteínas. A região central VP2, entre os aminoácidos 204 e 350, apresentou maior variabilidade, enquanto as extremidades N e C-terminais apresentaram-se conservadas (FIGURA 9).

Com base na diversidade dos aminoácidos localizados na região variável, nove sequências foram selecionadas para síntese comercial representando todos os polimorfismos de aminoácidos existentes em cada posição (TABELA 1).

Para proteína VP3, 145 sequências da poliproteína (N-VP2-VP4-VP3-C) e uma sequência truncada da VP3 (parcialmente sequenciada) foram selecionadas e alinhadas com o programa *ClustalW*. Ao contrário da VP2, o alinhamento mostrou que a VP3 é conservada ao longo de toda sua extensão (FIGURA 10) O segmento da poliproteína ABI52864.1, entre os aminoácidos 2239 e 3105, que corresponde à VP3 completa segundo Lazarus et al. (2008), foi selecionada.

FIGURA 9. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA PORÇÃO CENTRAL DE 35 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA VP2 REALIZADO COM O PROGRAMA ClustalW. (.) AMINOÁCIDOS CONSERVADOS.

	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
g 10945517 gb AAG24577.1 1-82	.	.	N	A	N	S	T	I	.	.	.
g 37936568 emb CAE52962.1 1-144	.	.	H	.	A	N	S	T	I	.	N
g 20379010 gb AAM21065.1 1-232	.	.	H	.	A	N	S	T	I	.	N
g 189092352 gb ACD75772.1 1-145	.	.	H	.	A	N	S	T	I	.	N
g 10945565 gb AAG24601.1 1-82	.	.	H	H	A	D	S	T	I	.	.
g 10945553 gb AAG24595.1 1-82	.	.	H	H	A	D	S	T	I	.	.
g 10945543 gb AAG24590.1 1-82	.	.	H	.	A	D	S	T	I	.	.
g 109729609 gb ABG46259.1 1-158	.	.	H	H	A	D	S	T	I	.	.
g 20379008 gb AAM21064.1 1-232	.	.	H	H	A	D	S	T	I	.	.
g 10945541 gb AAG24589.1 1-82	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.
g 125093230 gb ABN20793.1 1-453	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.
g 53980118 gb AAV24479.1 1-453	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.
g 125093229 gb ABN20792.1 1-453	.	.	K	S	.	A	N	I	.	D	E
g 53980117 gb AAV24478.1 1-453	.	.	K	S	.	A	N	I	.	D	E
g 10188490 emb CAC09148.1 1-452	.	.	H	.	.	N	T	.	.	.	R
g 2294916 emb CAA02337.1 1-1012	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	H
g 10945535 gb AAG24586.1 1-82	.	G	N	.	T	N	.	PV	F	.	.
g 10945527 gb AAG24582.1 1-82	.	G	N	.	T	T	N	.	PV	F	.
g 10945525 gb AAG24581.1 1-82	.	G	N	.	T	N	.	PV	F	.	.
g 219810406 gb ACL36365.1 1-146	.	G	D	.	T	N	.	PI	F	.	.
g 10945523 gb AAG24580.1 1-82	.	.	S	.	T	T	NT	.	PI	F	.
g 10945533 gb AAG24585.1 1-82	.	.	S	.	T	T	NT	.	PI	F	V
g 10945515 gb AAG24576.1 1-82	.	T	D	.	T	T	NT	.	PI	F	.
g 10945513 gb AAG24575.1 1-82	.	.	N	.	T	T	NT	.	PI	F	.
g 10945531 gb AAG24584.1 1-82	.	.	S	.	T	NY	.	PI	F	.	.
g 27306600 gb AAN99798.1 1-359	.	.	K	S	.	A	N	I	.	D	E
g 10945559 gb AAG24598.1 1-82	.	.	H	.	A	N	T	L	.	.	.
g 189092360 gb ACD75776.1 1-145	.	.	H	.	A	N	T	L	.	.	R
g 273103868 gb ACZ97575.1 1-158	.	.	H	.	A	N	T	L	.	.	R
g 189092358 gb ACD75775.1 1-145	.	.	H	H	L	A	N	T	L	.	R
g 189092354 gb ACD75773.1 1-140	.	.	H	.	.	.	N	T	L	.	R
g 126202231 gb ABN80428.1 1-228	.	.	H	.	.	.	N	T	.	.	R
g 27306601 gb AAN99799.1 1-33	.	.	H	.	.	.	N	T	.	.	.
g 10945553 gb AAG24596.1 1-82	.	.	H	.	.	.	N	T	.	.	.
g 10945557 gb AAG24597.1 1-82	.	.	H	.	.	.	N	T	.	.	.
Consensus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	T	L	F	S	A	N	I	D	A	I	T
	S	L	S	V	G	G	E	L	V	F	O
	T	S	V	O	G	L	V	L	G	A	T
	I	Y	I	G	F	D	G	T	T	V	I
	T	R	A	V	A	A	D	N	G	L	T
	A	G	D	N	L	M	P	F	N	L	V
	I	P	T	N	E	I	T	O	P	I	T
	S	I	K	L	E	I	V	T	S	K	S
	G	G	O	A	G	D	O	M	S	W	S
	A	S	G	S	L	A	V	T	I	H	G

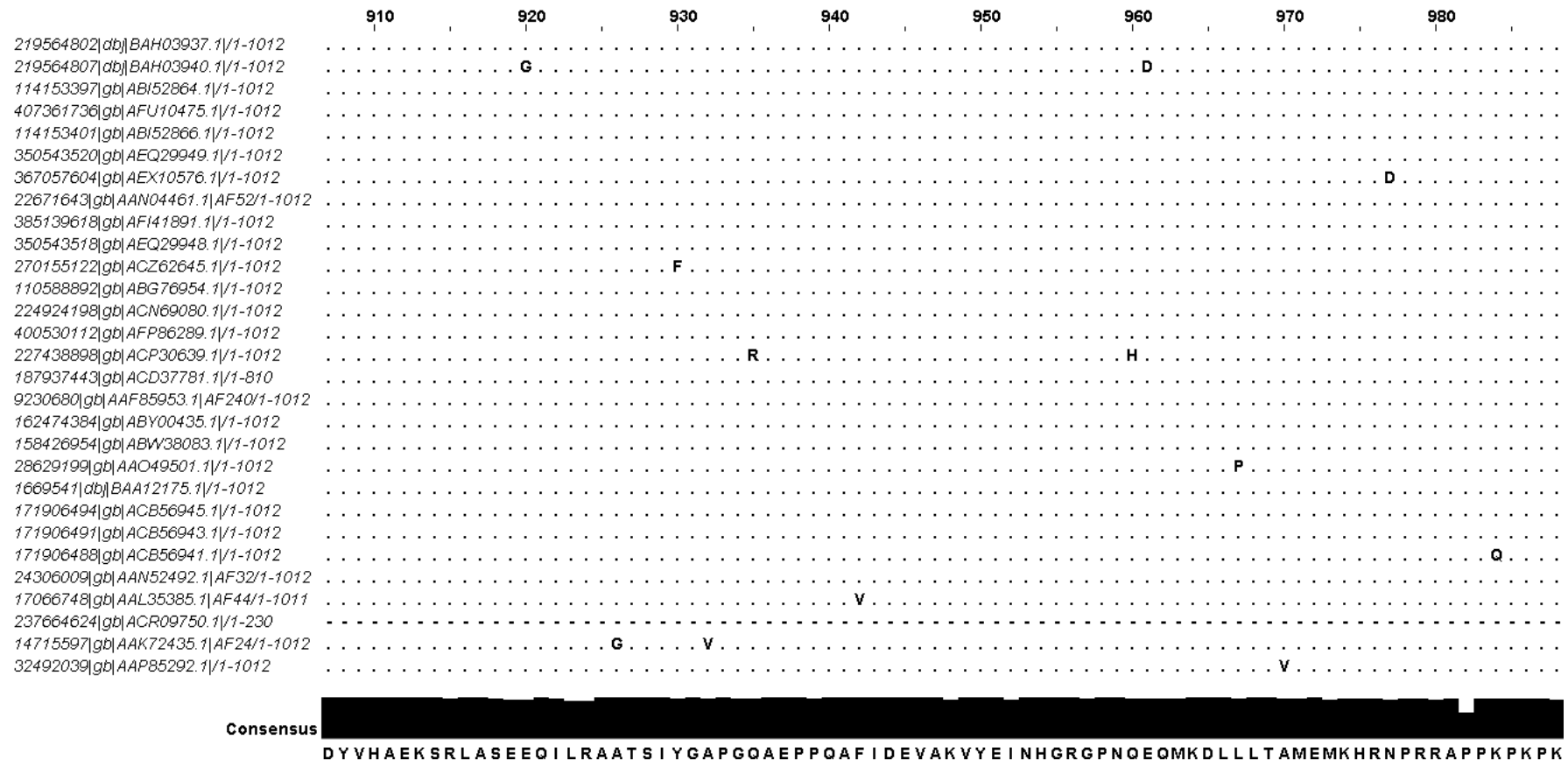
TABELA 1. SEQUÊNCIAS DA VP2 OBTIDAS DO GENBANK.  
AS SEQUÊNCIAS EM VERMELHO FORAM SELECIONADAS PARA SÍNTESE COMERCIAL BASEADAS NA VARIAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DA REGIÃO CENTRAL PROTEÍNA.

Sequência	Posição do aminoácido na região variável da VP2										Cepa/origem
	222	249	253	254	284	286	317	318	323	326-332	
AAM21069	S	Q	Q	G	A	T	S	G	D	*	Brazil isolado BR8
CAE52967	S	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSVRGS	isolate="Nobilis Gumboro 228E (vac.) Netherlands
<b>ACL36365</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>SWSASGS</b>	<b>strain="Lukert Brazil vacinal</b>
ABG46259	S	H	H	G	T	I	S	G	D	SWSASGS	isolate="Bursine-2" China
<b>AAM21064</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>SWSASGS</b>	<b>Bursine 2</b>
AAG24601	*	H	H	G	T	I	*	*/	*/	*	Ultravac" Brazil
AAG24595	*	H	H	G	T	I	*	*/	*/	*	Bursine II" Brazil Lukert
AAG24602	*	Q	Q	G	A	T	*	*/	*/	*	Brazil VV isolado Des603-BR
AEP04401	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	Brazil isolado MG-7
AAS19445	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brazil VV isolado BR2
AAS19444	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brazil VV isolado BR1
AAM21057	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brazil VV isolado BR5
AAS19449	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brasil isolado BR7
AAS19446	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brazil VV isolado BR3
AAS19447	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brazil VV isolado BR4
AAS19448	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D/G/*	*	Brazil VV isolado BR6
ABB88945	A	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	Brazil isolado MG7
<b>ABI52864</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>SWSASGS</b>	<b>Lazarus vacinal</b>
AAG24577	*	N	Q	G	T	I	*	*/	*/	*	Brazil isolado Lukert
CAE52962	L	H	Q	G	T	I	N	G	D	SWSASGS	isolate="BURSINE Plus (vaccine USA
AAM21065	L	H	Q	G	T	I	N	G	D	SWSASGS	Bursine plus
<b>ACD75772</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>SWSASGS</b>	<b>strain="vaccine Bursine Plus Brazil Lukert</b>
AAG24590	*	H	Q	G	T	I	*	*/	*/	*	Lukert USA
ABN20793	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	Variante E
AAV24479	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	Variante E
AAG24589	*	Q	Q	G	A	T	*	*/	*/	*	Edgar USA
<b>CAA02337</b>	<b>P</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>SWSASGS</b>	<b>strain="FARRAGHER</b>
AAG24604	*	Q	Q	G	A	T	*	*/	*/	*	Brazil VV isolado MC599-BR
AAG24603	*	Q	Q	G	A	T	*	*/	*/	*	Brazil VV isolado MC597-BR
AAG24598	*	Q	H	G	T	T	*	*/	*/	*	Gumborvet Brazil cepa GBV-8, Lukert
ACD75776	P	Q	H	G	T	T	S	G	D	SWSARGS	vaccine Gumbor- Brazil
AC297575	P	Q	H	G	T	T	S	G	D	SWSARGS	isolate="Bursa Vac 3 Taiwan
ACD75775	P	Q	H	G	T	T	S	G	D	LWSARGS	vaccine Cevac-Gumbo-L Brazil
<b>ACD75773</b>	<b>P</b>	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>SWSARGS</b>	<b>vaccine BUR-706 Brazil strain S706</b>
AAQ00947	P	Q	H	G	T	T	S	G	D	SWSARGS	isolate="Bursine-2"
ABN80428	P	Q	H	G	T	T	S	G	D	SWSARGS	isolate="Vi Bursa G" USA
CAC09148	P	Q	H	G	T	T	S	G	D	SWSARGS	[Escherichia coli] vacinal
AAG24596	*	Q	H	G	T	T	*	*/	*/	*	Gumboral CT" Brazil
AAG24597	*	Q	H	G	T	T	*	*/	*/	*	Gumboro Nobilis Brazil cepa D78 ou 228
AAN99799	*		H	G	T	*	*	*/	*/	*	variante E vacinal não recombinante
AEP04403	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	brazil classical virulent isolado A-BH83
AAM21066	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	Bursavac
ABD97260	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSVSGS	Brazil classical isolado A-BH83
ACD75777	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWLASGN	vac. Poulvac-Bursa-F Brazil cepa Austrália V-877
AAQ00948	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	isolate="CEVAC IBD L" Korea???
CAE52968	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	isolate="Bursaplex (vaccine) USA
ACD75774	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	vaccine Cevac-IBD-L Brazil Winterfield 2512
ABC86601	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	Winterfield 2512 USA
CAG14933	P	Q	Q	G	A	T	S	G	D	SWSASGS	isolate="CEVAC IBD L Hungary
ABV04331	P	Q	Q	G	A	T	*	D/*	D/*	*	IBD Blen USA
AAG24594	*	Q	Q	G	A	T	*	*/	*/	*	AvimmuneF Brazil cepa Moulthrop - G 603,
<b>AAG24580</b>	<b>*</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>*</b>	<b>*/</b>	<b>*/</b>	<b>*</b>	<b>Brazil isolado G52</b>
AAG24585	*	Q	Q	S	A	T	*	*/	*/	*	Brazil isolado G75
AAG24576	*	Q	Q	D	A	T	*	*/	*/	*	Brazil isolado G11
AAG24584	*	Q	Q	S	A	T	*	*/	*/	*	Brazil isolado G72
AAG24575	*	Q	Q	N	A	T	*	*/	*/	*	Brazil isolado G07
<b>ABN20792</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>SWSASGS</b>	<b>Variante E Delaware vacinal recomb</b>
AAV24478	T	K	Q	S	A	I	S	D	E	SWSASGS	Variante E Delaware vacinal recomb
AAN99798	T	K	Q	S	A	I	S	D	E	SWSASGS	variante E vacinal não recomb Netherlands
AAG24600	*	Q	Q	G	A	T	*	*/	*/	*	Matternalin Brazil
AAG24599	*	R	H	G	T	T	*	*/	*/	*	Gumboxax Brazil
<b>AAG24586</b>	<b>*</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>*</b>	<b>*/</b>	<b>*/</b>	<b>*</b>	<b>Brazil isolado G79</b>
AAG24582	*	Q	Q	N	A	T	*	*/	*/	*	Brazil isolado G68
AAG24581	*	Q	Q	N	A	T	*	*/	*/	*	Brazil isolado G67

\* aminoácidos não sequenciados



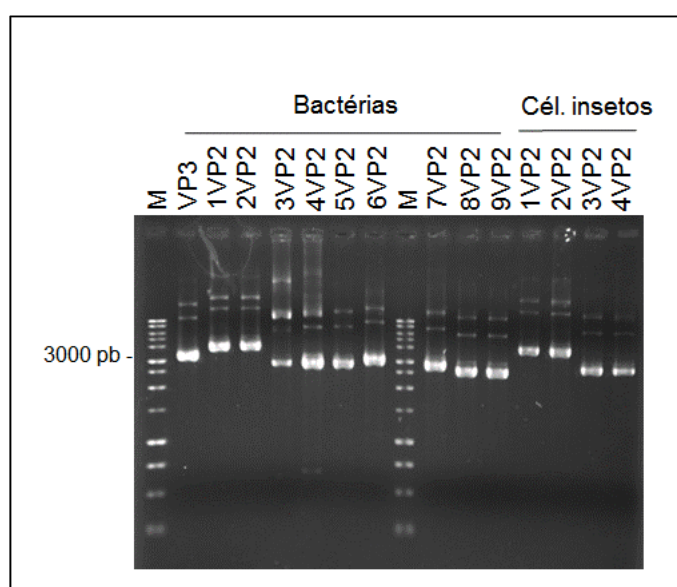
FIGURA 10. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE 29 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA VP3 REALIZADO COM O PROGRAMA ClustalW. (-) AMINOÁCIDOS NÃO SEQUENCIADOS, (.) AMINOÁCIDOS CONSERVADOS.



## 5.2 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM

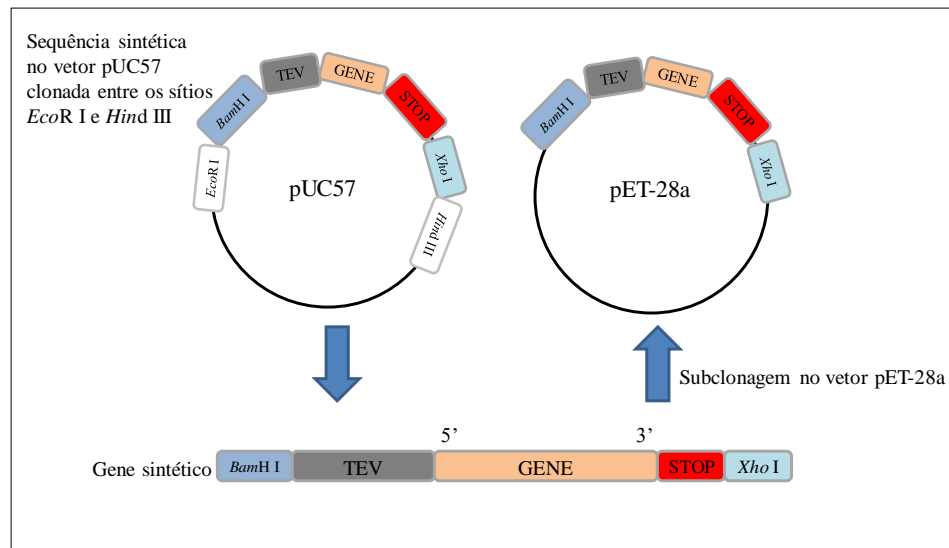
As sequências nucleotídicas das proteínas selecionadas foram sintetizadas comercialmente e recebidas clonadas no plasmídeo pUC57. Os clones sintéticos liofilizados foram ressuspensos em água livre de *rnases* e amplificados em *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  de cálcio competentes, purificados com o kit QIAprep Spin Miniprep e quantificados por espectrofotometria (FIGURA 11).

FIGURA 11. DNA DOS GENES SINTETIZADOS NO pUC57. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO 0,5  $\mu$ g/mL. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 kb (PROMEGA).



A escolha do sistema de expressão das proteínas foi baseada em dados descritos na literatura. A expressão da VP2 e da VP3 é relatada em sistemas procariotos e eucariotos. Todos os genes otimizados foram clonados no pUC57 entre os sítios *EcoRI* e *HindIII*. As duas sequências completas da VP2 e a sequência da VP3, identificadas como 1VP2ec, 2VP2ec e VP3, respectivamente, foram otimizadas para expressão em *E. coli*. Os sítios da enzima de restrição *BamHI* e a sequência de reconhecimento da enzima TEV foram incluídos a montante. A jusante foi introduzido um códon de parada TAA e o sítio da enzima *XhoI*. O gene foi subclonado no vetor de expressão pET-28a posteriormente à etiqueta de seis histidinas (6xHis) 5' do vetor (FIGURA 12).

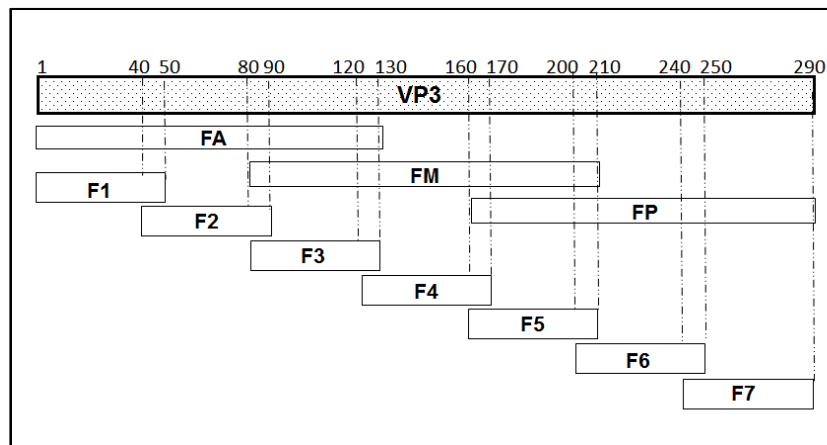
FIGURA 12. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS PROTEÍNAS 1VP2ec, 2VP2ec e VP3 PARA EXPRESSÃO EM BACTÉRIAS. AS SEQUÊNCIAS FORAM SUBCLONADAS NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a.



FONTE: ASSUNÇÃO, 2016 (não publicado).

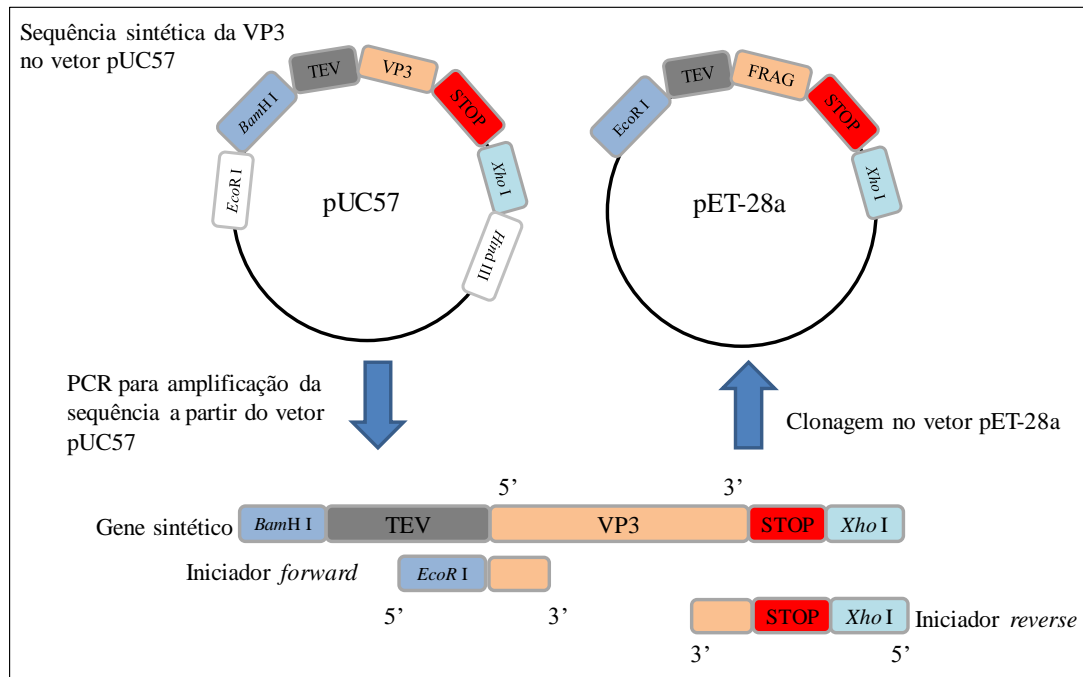
A sequência da VP3 foi fragmentada para identificar e localizar epítopos ao longo da proteína. Foram obtidos os fragmentos FA (anterior), FM (médio) e FP (posterior) da proteína contendo 130 aminoácidos sobrepostos em 50 aminoácidos. Fragmentos menores da VP3, identificados como F1 a F7, foram desenhados com 50 aminoácidos, sobrepostos em 10 aminoácidos (FIGURA 13).

FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FRAGMENTAÇÃO DA SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA VP3. 1 A 290 POSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DA VP3; FA: FRAGMENTO ANTERIOR DA VP3; FM: FRAGMENTO MÉDIO DA VP3; FP: FRAGMENTO POSTERIOR DA VP3; F1 A F7: FRAGMENTOS 1 AO 7 DA VP3.



Os fragmentos FA, FM e FP foram obtidos por PCR com iniciadores desenhados para amplificar regiões da sequência nucleotídica completa. Aos iniciadores foram incluídos as sequências dos sítios *EcoRI* e *XhoI*, na extremidade 5'. (FIGURA 14).

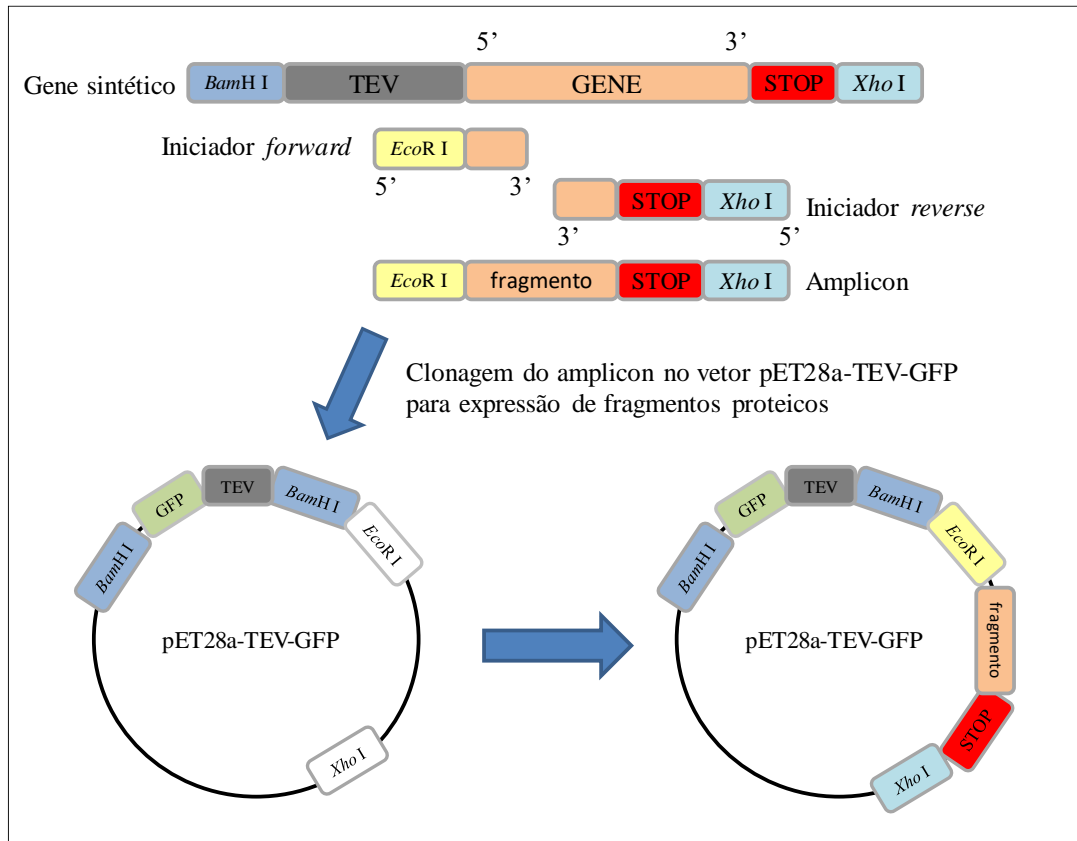
FIGURA 14. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DOS FRAGMENTOS FA, FM E FP DA VP3 PARA EXPRESSÃO EM BACTÉRIAS. OS GENES FORAM AMPLIFICADOS POR PCR E CLONADOS NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a.



FONTE: ASSUNÇÃO, 2016 (não publicado).

Os fragmentos F1 a F7 da VP3 foram fusionados às sequências da GFP e de reconhecimento da enzima TEV na porção N-terminal do peptídeo. Os genes da GFP e do sítio TEV foram previamente inseridos no sítio *BamHI* do vetor de expressão. A mesma estratégia de clonagem foi aplicada às sequências truncadas da VP2 (FIGURA 15).

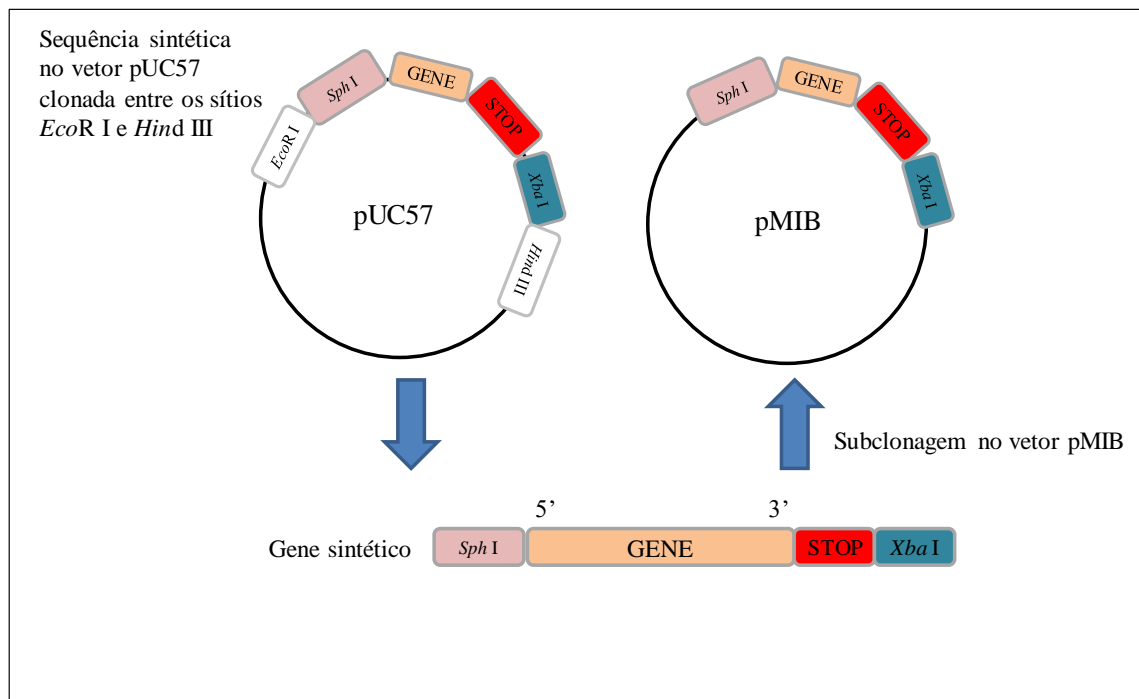
FIGURA 15. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DOS FRAGMENTOS F1 AO F7 DA VP3 E DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 PARA EXPRESSÃO EM BACTÉRIAS. OS GENES FORAM AMPLIFICADOS POR PCR E CLONADOS NO VETOR DE EXPRESSÃO pET-28a FUSIONADO À GFP.



FONTE: ASSUNÇÃO, 2016 (não publicado).

As sequências da VP2 também foram otimizadas para expressão em células de inseto. O sítio da endonuclease *Sph*I foi incluído na extremidade 5' do gene sintético, e sete códon de histidina, uma sequência codificadora de códon de parada (TGAATGAATGATCTAGA) e o sítio da *Xba*I foram acrescentados na extremidade 3'. Os genes das sequências inteiras, 1VP2in e 2 VP2in, foram subclonados no vetor de expressão pMIB/V5-His A (FIGURA 16).

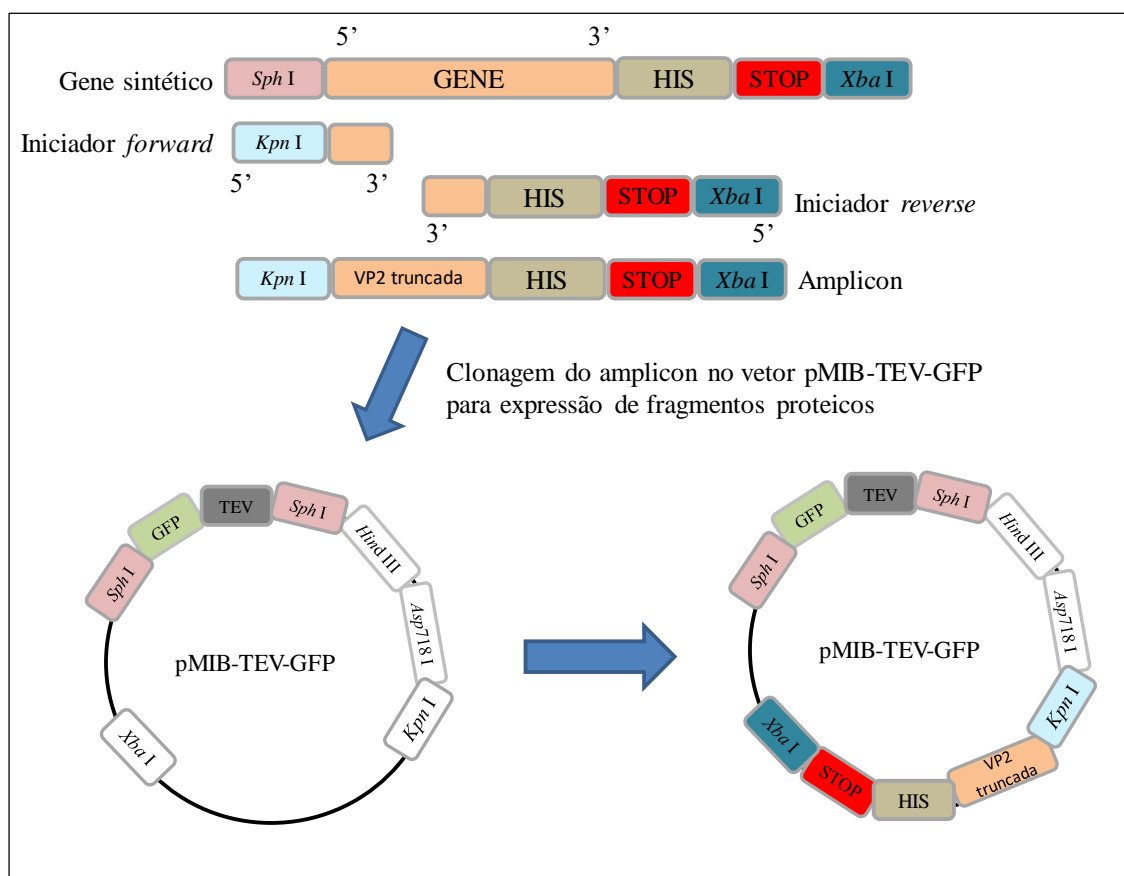
FIGURA 16. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS PROTEÍNAS 1VP2IN, 2VP2IN PARA EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETOS. AS SEQUÊNCIAS FORAM SUBCLONADAS NO VETOR DE EXPRESSÃO pMIB/V5-His A.



FONTE: ADAPTADO DE ASSUNÇÃO (não publicado).

Os genes das sequências truncadas da VP2, para expressão em células de inseto, foram amplificados por PCR com iniciadores contendo as sequências *Kpn*I e *Xba*I, na extremidade 5'. Os genes foram clonados no pMIB/V5-His A fusionado, na extremidade 5', às sequências da GFP e de reconhecimento da enzima TEV. O gene da GFP e a sequência TEV foram previamente inseridos no sítio *Sph*I do vetor de expressão (FIGURA 17).

FIGURA 17. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 PARA EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETOS. OS GENES FORAM AMPLIFICADOS POR PCR E CLONADOS NO VETOR DE pMIB/V5-His A FUSIONADO À GFP.



FONTE: ADAPTADO DE ASSUNÇÃO, 2016 (não publicado).

As sequências das proteínas selecionadas para testar os antígenos recombinantes, assim como os fragmentos da VP3 para mapear as regiões antigênicas estão resumidas na tabela 2.

### 5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

Os vetores de expressão pET 28a e pMIB/V5-His A foram amplificados em *E. coli* cepa DH5α cálcio competentes, purificados com os kits QIAprep Spin Miniprep ou NucleoSpin Plasmid QuickPure e quantificados por espectrofotometria.

TABELA 2. SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS VP2 E VP3 PARA TESTAR ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA DIAGNOSTICAR A IBD E FRAGMENTOS DA VP3 PARA MAPEAR AS REGIÕES ANTIGÊNICAS.

Sequência NCBI	Identificação	Nº de aa *	Nº de aa da proteína de fusão GFP **	Peso Molecular *
ABI52864.1	1VP2ec	493	-	52,70
	1VP2in	480	-	51,65
CAA02337.1	2VP2ec	493	-	52,75
	2VP2in	480	-	51,70
ACL36365.1	3VP2ec	441	287	47,97
	3VP2in	428	277	46,97
ACD75772.1	4VP2ec	440	287	47,96
	4VP2in	427	277	47,01
ABN20792.1	5VP2ec	446	287	48,69
	5VP2in	433	277	47,76
AAM21064.1	6VP2ec	527	287	57,02
	6VP2in	514	277	56,09
ACD75773.1	7VP2ec	435	287	47,48
	7VP2in	422	277	46,52
AAG24580.1	8VP2ec	376	287	41,33
	8VP2in	363	277	40,38
AAG24586.1	9VP2ec	376	287	41,25
	9VP2in	363	277	40,30
ABI52864.1	VP3	331	-	37,08
	FA	166	-	18,24
	FM	166	-	18,36
	FP	166	-	18,65
	F1	337	287	37,73
	F2	337	287	37,36
	F3	337	287	37,33
	F4	337	287	37,71
	F5	337	287	37,66
	F6	337	287	37,43
	F7	337	287	37,73

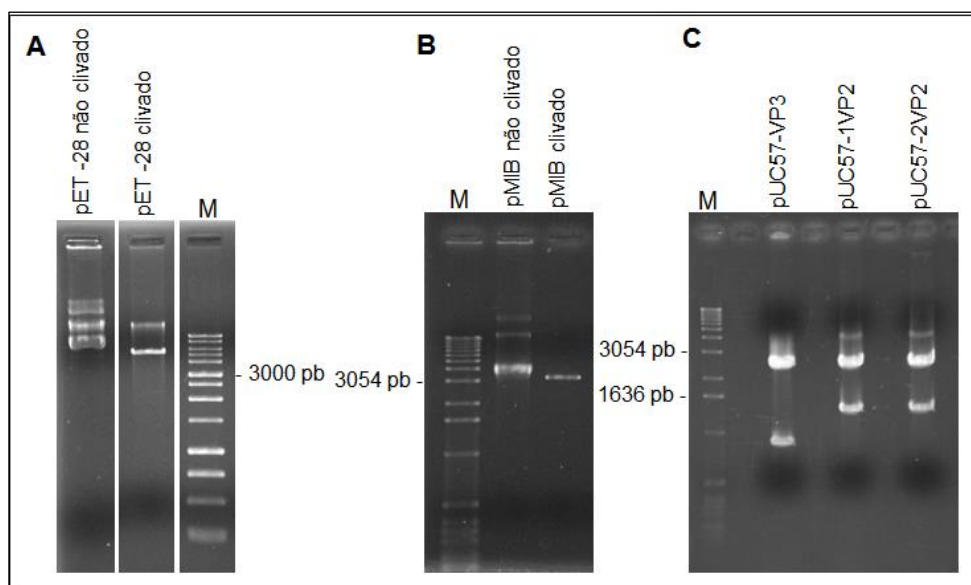
ec: otimizada para expressão em bactérias. in: otimizada para expressão em células de insetos. Sequências inteiras: 1VP2, 2VP2 e VP3; Sequências truncadas: 3VP2, 4VP2, 5VP2, 6VP2, 7VP2, 8VP2 e 9VP2; FA: fragmento anterior da VP3; FM: fragmento médio da VP3; FP: fragmento posterior da VP3; F1 ao F7: fragmentos 1 ao 7 da VP3. \*Número de aminoácidos e peso molecular das sequências proteicas a partir da primeira metionina do vetor de expressão até o códon de parada. \*\*Número de aminoácidos da proteína GFP fusionada às sequências truncadas da VP2 e aos fragmentos 1 ao 7 da proteína VP3, a partir da primeira metionina do vetor de expressão incluindo a sequência do sítio de ligação da enzima TEV.



## 5.4 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS VP2 E VP3 COMPLETAS

Os genes das sequências inteiras das proteínas foram clonados nos vetores de expressão pET-28a (1VP2ec, 2VP2ec e VP3) e pMIB/V5-His A (1VP2in e 2VP2in). O DNA dos vetores e das sequências da VP2 e da VP3 no pUC57 foram digeridos com as enzimas *Bam*HI / *Xho*I e *Sph*I / *Xba*I, para expressão em bactérias e células de insetos, respectivamente (TABELA 3). Os plasmídeos linearizados foram aplicados em gel de agarose 0,8% (FIGURA 18). As bandas de interesse foram removidas do gel, o DNA foi purificado com o kit QIAquick Gel Extraction e quantificado por espectrofotometria. A seguir, os genes das proteínas foram ligados aos vetores pET-28a ou pMIB/V5-His A. As reações de ligação foram transformadas em bactérias cepa DH5 $\alpha$  cálcio competentes. As colônias positivas para os clones recombinantes foram selecionadas em meio ágar LB com canamicina (pET28a) e ampicilina (pMIB/V5-His A). Os clones recombinantes foram confirmados por PCR de colônia ou pela técnica de palitagem e inoculados em LB/canamicina ou ampicilina. Em seguida, foram purificados com os kits QIAprep Spin Miniprep ou NucleoSpin Plasmid QuickPure e quantificados por espectrofotometria. A inserção correta dos genes e a ausência de mutações foram confirmadas por sequenciamento.

FIGURA 18. REAÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA DOS VETORES DE EXPRESSÃO E DO pUC57. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO 0,5  $\mu$ g/mL A. DIGESTÃO DO pET-28a COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Bam*HI e *Xho*I; B. DIGESTÃO DO pMIB/V5-His A COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Sph*I e *Xba*I; C. DIGESTÃO DO DNA DOS GENES VP3, 1VP2 E 2VP2 NO pUC57 PARA LIBERAÇÃO DOS INSERTOS: VP3 906 pb, 1VP2 1380 pb E 2VP2 1380 pb. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 kb (PROMEGA) E 1kb (INVITROGEN).



## 5.5 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS FA, FM e FP

Os genes dos fragmentos maiores (FA, FM, FP) da VP3 foram clonados no vetor de expressão pET-28a para expressão em *E. coli*. Os genes foram obtidos por PCR utilizando como molde a sequência nucleotídica completa da VP3 clonada no pUC57. O vetor de expressão e os genes dos fragmentos foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (TABELA 3). Os plasmídeos linearizados foram aplicados em gel de agarose 0,8%. As bandas de interesse foram removidas do gel, purificados com o kit QIAquick Gel Extraction e quantificados por espectrofotometria. Os insertos foram purificados com o kit QIAquick PCR Purification. A seguir, os genes dos fragmentos foram ligados ao vetor pET-28a. As colônias positivas para o clone foram selecionadas em meio ágar LB com canamicina. Os clones recombinantes foram confirmados por PCR de colônia e inoculados em LB/canamicina. Em seguida, foram purificados com o kit NucleoSpin Plasmid QuickPure e quantificados por espectrofotometria. A inserção correta dos genes e a ausência de mutações foram confirmadas por sequenciamento.

## 5.6 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 E FRAGMENTOS F1 A F7

À região N-terminal das sequências truncadas da proteína VP2 (8,2 a 24,0 kDa) e dos fragmentos 1 ao 7 da proteína VP3 (5,4 a 5,8 kDa) foi fusionada a sequência da proteína GFP (*green fluorescent protein*) e clonadas nos vetores de expressão para células de insetos e bactérias entre os sítios *KpnI*/ *XbaI* e *EcoRI*/ *XhoI*, respectivamente (TABELA 3). A proteína GFP foi incluída para aumentar a massa molecular dos peptídeos em 31,3 kDa para expressão em células de insetos e 32,0 kDa para expressão em bactérias. A massa da proteína de fusão foi considerada a partir da primeira metionina do vetor de expressão. Além disso, a GFP é solúvel, estável, resistente ao pH alcalino, a detergentes, a sais e a diversas proteases e não altera a atividade da proteína alvo. Funciona como indicador da transformação, pois pode-se detectar sua fluorescência. O gene da GFP foi primeiro clonado nos vetores de expressão pET-28a e pMIB/V5-His. Em seguida, as sequências das proteínas foram clonadas nos vetores de expressão com a GFP.

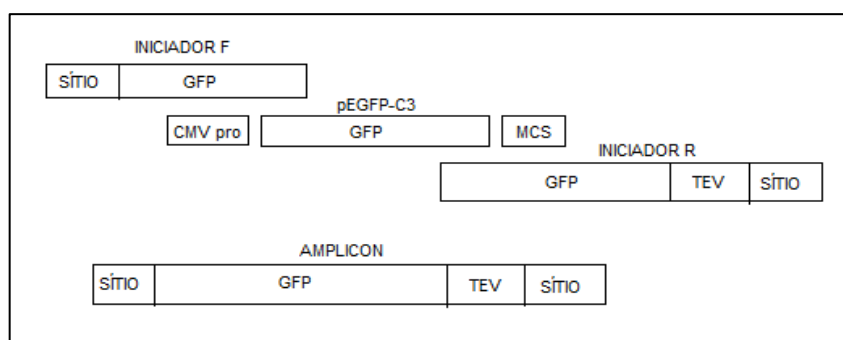
TABELA 3. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS PROTEÍNAS VP2, VP3 E FRAGMENTOS.

Gene	Sistema de expressão	Vetores de expressão	Origem do inserto	Enzimas de restrição
VP2 inteira	Bactérias	pET28a	Subclonagem	<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I
	Insetos	pMIB/V5		<i>Sph</i> I/ <i>Xba</i> I
VP3 inteira	Bactérias	pET28a	Subclonagem	<i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I
VP2 truncadas	Bactérias	pET28a - GFP	PCR	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
	Insetos	pMIB/V5 - GFP		<i>Kpn</i> I/ <i>Xba</i> I
Fragmentos VP3 (FA, FM, FP)	Bactérias	pET28a	PCR	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
Fragmentos VP3 (F1 a F7)	Bactérias	pET28a -GFP	PCR	<i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I

### 5.6.1 Obtenção da GFP

O gene da proteína GFP foi obtido do vetor pEGFP-C3 que foi amplificado em *E. coli* DH5α cálcio competentes. O DNA do pGFP-C3 foi purificado com o kit QIAprep Spin Miniprep e quantificado por espectrofotometria. O gene da proteína GFP, com 756 pares de bases, foi amplificado por PCR utilizando como molde o plasmídeo pE-GFP-C3. Os sítios da endonuclease *Bam*HI e *Sph*I, para a expressão em *E. coli* e células de insetos, respectivamente, foram incluídos nos iniciadores F e R (FIGURA 19). Considerando que a sequência da GFP pudesse interferir na resposta do teste, a sequência gênica do sítio de reconhecimento da protease do vírus TEV foi incluída no iniciador R para remoção da GFP, após a purificação das proteínas (CESARATTO et al., 2016).

FIGURA 19. INICIADORES F E R PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA GFP. OS INICIADORES CONTÊM OS SÍTIOS DA ENDONUCLEASE *Bam*HI (EXPRESSÃO COM pET-28a) OU *Sph*I (EXPRESSÃO COM pMIB/V5) E A SEQUÊNCIA GÊNICA DO SÍTIO DE RECONHECIMENTO DA PROTEASE DO VÍRUS TEV.

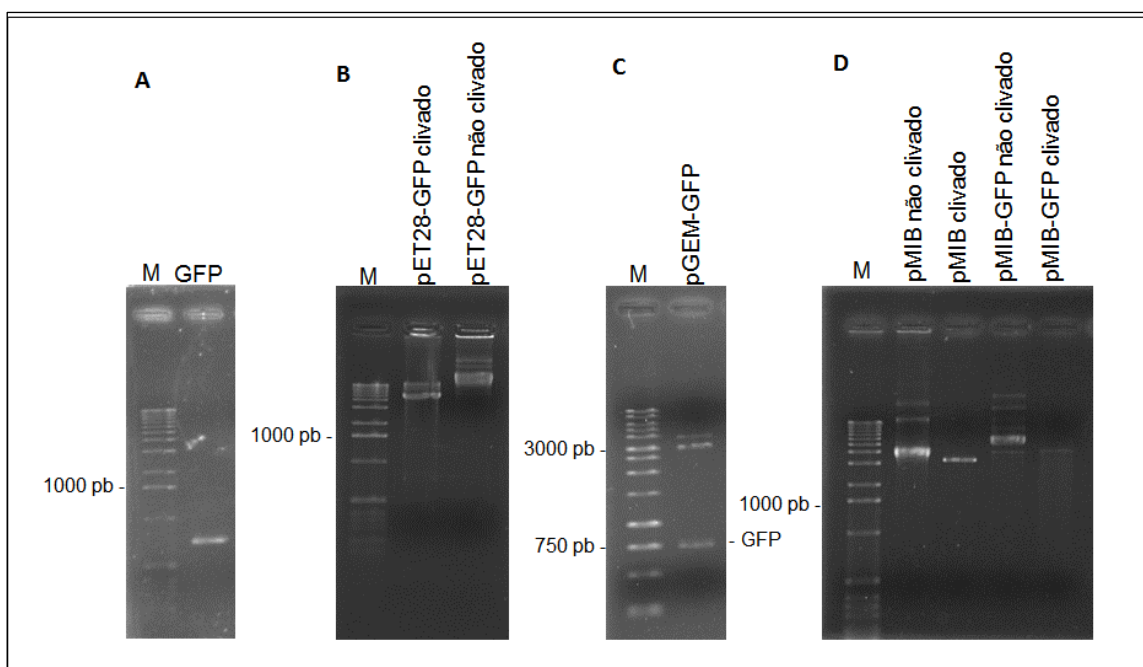


O DNA amplificado da proteína GFP foi aplicado em gel 0,8%. A banda de interesse foi removida do gel e purificada com o kit QIAquick Gel Extraction (FIGURA 20-A).

#### FIGURA 20. CLONAGEM DA GFP NOS VETORES DE EXPRESSÃO.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO 0,5 µg/mL.

A. DNA DA GFP AMPLIFICADO POR PCR UTILIZANDO COMO MOLDE O pEGFP-C3.; B. DIGESTÃO DO pET-28a-GFP COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *EcoRI* e *XhoI*; C. DIGESTÃO DO DNA pGEM-T Easy COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *SphI* PARA LIBERAÇÃO DA GFP COM 756 pb; D. DIGESTÃO DO pMIB/V5-His E DO pMIB/V5-His-GFP COM AS ENZIMAS *SphI* E *XbaI* / *KpnI*, RESPECTIVAMENTE. M: MARCADORES DE PESO MOLECULAR DE 1 kb (PROMEGA) E 1kb (INVITROGEN).



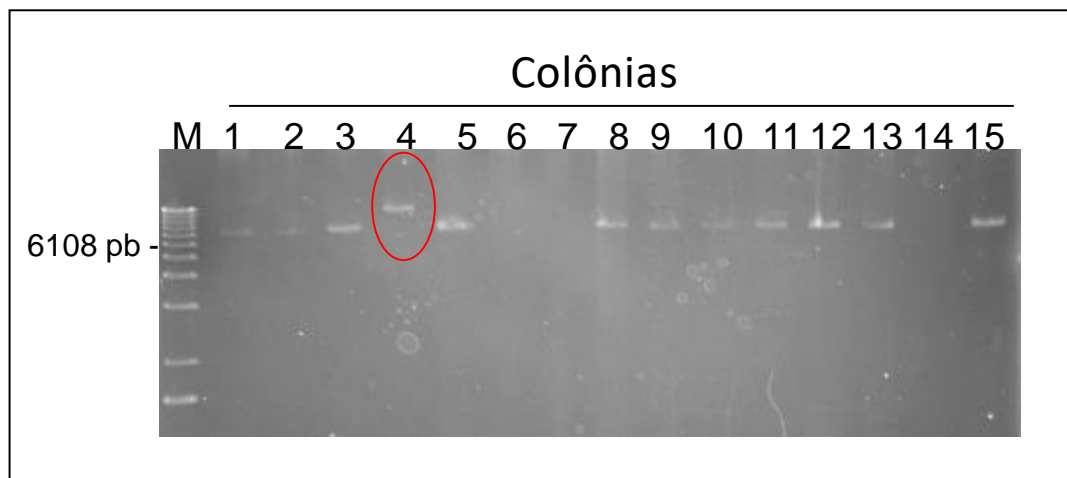
#### 5.6.2 Clonagem da GFP no vetor pET-28a

O pET-28a foi amplificado transformando cepas DH5α de *E. coli* cálcio competentes, purificados com o kit QIAprep Spin Miniprep e quantificado por espectrofotometria. O plasmídeo pET-28a e as extremidades do gene da GFP obtido por PCR (item 5.6.1) foram digeridos com a enzima *Bam*HI (FIGURA 20-B). Os plasmídeos linearizados e os genes foram aplicados em gel de agarose 0,8%. As bandas de interesse foram removidas do gel, purificados com o kit QIAquick Gel Extraction e quantificados por espectrofotometria.

Para melhorar a eficiência da clonagem e evitar a recircularização do vetor após a digestão, os elementos 5'P foram removidos das extremidades do DNA com fosfatase alcalina. A ligação do inserto foi realizada com o pET-28a não desfosforilado

na proporção molar inserto:vetor de 3:1 e com o vetor desfosforilado na proporção de 10:1. Células de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  cálcio competentes foram transformadas com as reações de ligação plaqueadas e colônias foram analisadas por PCR de colônia e pela técnica de palitagem para confirmação do clone recombinante (FIGURA 21).

FIGURA 21. CONFIRMAÇÃO POR *TOOTHPICK* DO CLONE DE GFP RECOMBINANTE EM pET-28a. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%, CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO 0,5  $\mu$ g/ml DO MATERIAL DE COLÔNIAS DE *E. coli* DH5 $\alpha$  TRANSFORMADAS COM REAÇÕES DE LIGAÇÃO COM O pET-28A NÃO DESFOSFORILADO. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 KB (INVITRO-GEN). COLÔNIA 4 INDICA A LIGAÇÃO DO INSERTO (GFP) COM 756 PARES DE BASE NO pET-28A.



Bactérias de *E. coli* cepa BL21 Star foram transformadas com o clone positivo. A presença da GFP foi confirmada com a detecção da fluorescência em placa LB-ágar e IPTG (FIGURA 22). A inserção correta do gene da GFP e a ausência de qualquer mutação foram verificadas pelo sequenciamento.

FIGURA 22. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GFP EM PLACA DE LB-ÁGAR CONTENDO CANAMICINA (50  $\mu$ g/ml) E IPTG. COLÔNIAS DE *E. coli* CEPA BL21 Star TRANSFORMADAS COM pET-28a.



### 5.6.3. Clonagem da GFP no vetor pMIB/V5-His

O vetor de expressão pMIB/V5-His A foi amplificado transformando cepas DH5 $\alpha$  de *E. coli* cálcio competentes, purificados com o kit QIAprep Spin Miniprep e quantificado por espectrofotometria. O fragmento da GFP foi obtido por amplificação do gene do pEGFP-C3 (item 5.6.1), utilizando os iniciadores mostrados na figura 19. O pMIB/V5-His e as extremidades do fragmento da GFP foram digeridos com a enzima *SphI* e realizada a ligação do inserto ao vetor (FIGURA 20-D).

Várias tentativas de clonagem do gene da GFP no vetor de expressão para células de inseto foram realizadas sem sucesso. Verificou-se que a enzima *SphI* cliva com baixa eficiência (0 a 50%) extremidades de fragmentos de DNA lineares (NEB 2016a). Como alternativa, o gene amplificado da GFP foi subclonado no pGEM-T Easy. Este vetor é linearizado e apresenta 3000 pares de bases, adequado para clonagem de produtos de PCR. O vetor contém uma 3'-timidina terminal em ambas as extremidades que previne a recircularização do vetor e melhora a eficiência da ligação de produtos de PCR. O gene da GFP foi amplificado por PCR, aumentando o tempo de extensão no final da reação. A polimerase introduziu uma desoxiadenosina na extremidade 3' do amplicon para pareamento com a timidina terminal do vetor. A ligação foi realizada seguindo o protocolo do fabricante. Bactérias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  cálcio competentes foram transformadas com os vetores ligados à GFP e plaqueados em LB-ágar/ampicilina/IPTG/X-gal. A seleção dos clones recombinantes é baseada na  $\alpha$ -complementação. As colônias brancas positivas foram confirmadas com a técnica de *toothpick* e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ , por digestão com a enzima de restrição *SphI* (FIGURA 20-C). Os clones positivos foram purificados seguindo o protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep.

O inserto obtido através da clonagem no pGEM-T Easy foi ligado ao pMIB/V5-His. A reação de ligação foi testada com vetores de expressão não desfosforilados e fosforilados. Após transformação em *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  cálcio competentes, os clones foram analisados por *toothpick* e por digestão com a enzima *SphI* para confirmação da presença do clone. Foram obtidos mais clones positivos com os vetores desfosforilados. Os clones positivos foram inoculados em meio LB contendo canamicina e purificadas com o QIAprep Spin Miniprep. Os clones recombinantes foram enviados para sequenciamento e um clone foi confirmado com a correta inserção do gene da GFP e a ausência de mutações.

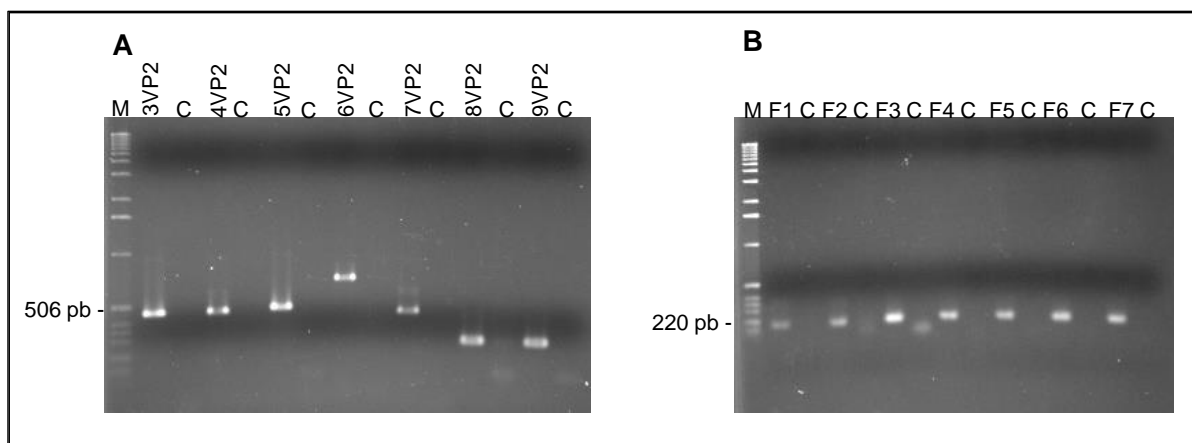
#### 5.6.4 Clonagem nos vetores pET-28a-GFP e pMIB/V5-His-GFP

Os vetores de expressão fusionados à GFP foram amplificados em *E. coli* DH5α cálcio competentes, purificados com o kit QIAprep Spin Miniprep e quantificados por espectrofotometria. Os genes das sequências truncadas da VP2 e dos fragmentos 1 ao 7 da VP3 foram amplificados por PCR utilizando como molde os genes clonados no pUC57 (FIGURA 23). Os vetores pET-GFP e pMIB-GFP foram digeridos com as enzimas *EcoRI*/*XhoI* e *KpnI*/*XbaI*, respectivamente. Os insertos foram digeridos seguindo o mesmo protocolo. Os plasmídeos digeridos foram aplicados em gel 0,8%. As bandas referentes aos plasmídeos linearizados foram removidas do gel e purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction. Os insertos digeridos foram purificados com o kit QIAquick PCR Purification ou MinElute PCR Purification.

Os insertos foram ligados nos vetores fusionados à GFP. As reações de ligação foram transformadas em bactérias cepa DH5α cálcio competentes. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio ágar LB com canamicina (pET28a) e ampicilina (pMIB/V5-His A). Os clones foram confirmados por PCR de colônia e pela técnica de palitagem e inoculados em LB/canamicina ou ampicilina. Em seguida, foram purificados com os kits QIAprep Spin Miniprep ou NucleoSpin Plasmid QuickPure e quantificados por espectrofotometria. A inserção correta dos genes e a ausência de mutações foram confirmadas por sequenciamento.

FIGURA 23. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DAS SEQUÊNCIAS TRUNCADAS DA VP2 E DOS FRAGMENTOS 1 A 7 DA VP3.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%, CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO 0,5 µg/mL DNA AMPLIFICADO POR PCR PARA CLONAGEM NOS VETORES DE EXPRESSÃO FUSIONADOS À GFP. A: DNA AMPLIFICADO DAS PROTEÍNAS TRUNCADAS VP2; B: DNA AMPLIFICADO DOS FRAGMENTOS 1 AO 7 DA PROTEÍNA VP3. M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1 KB INVITROGEN. C: CONTROLE DAS REAÇÕES DE PCR.



## 5.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

### 5.7.1 Proteína VP2

O sistema eucarioto de expressão em células de insetos foi escolhido para promover o dobramento correto da proteína VP2. A utilização foi estimulada por um caso bem-sucedido de expressão de uma enzima polimerase em nosso laboratório. Não obtivemos sucesso na expressão e considerando o custo e tempo, maiores que o sistema procariótico, decidimos focar os esforços na expressão em bactérias por ser um sistema mais simples e rápido.

No sistema procarioto foram testadas várias condições com o intuito de obter a proteína na forma solúvel para manter o enovelamento necessário para expor os epitopos conformacionais. Os experimentos foram conduzidos com uma sequência inteira e uma truncada com diferentes cepas de *E. coli*, temperaturas, tempos de expressão e concentrações de IPTG (TABELA 4).

TABELA 4. TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP2 EM *E. coli*.

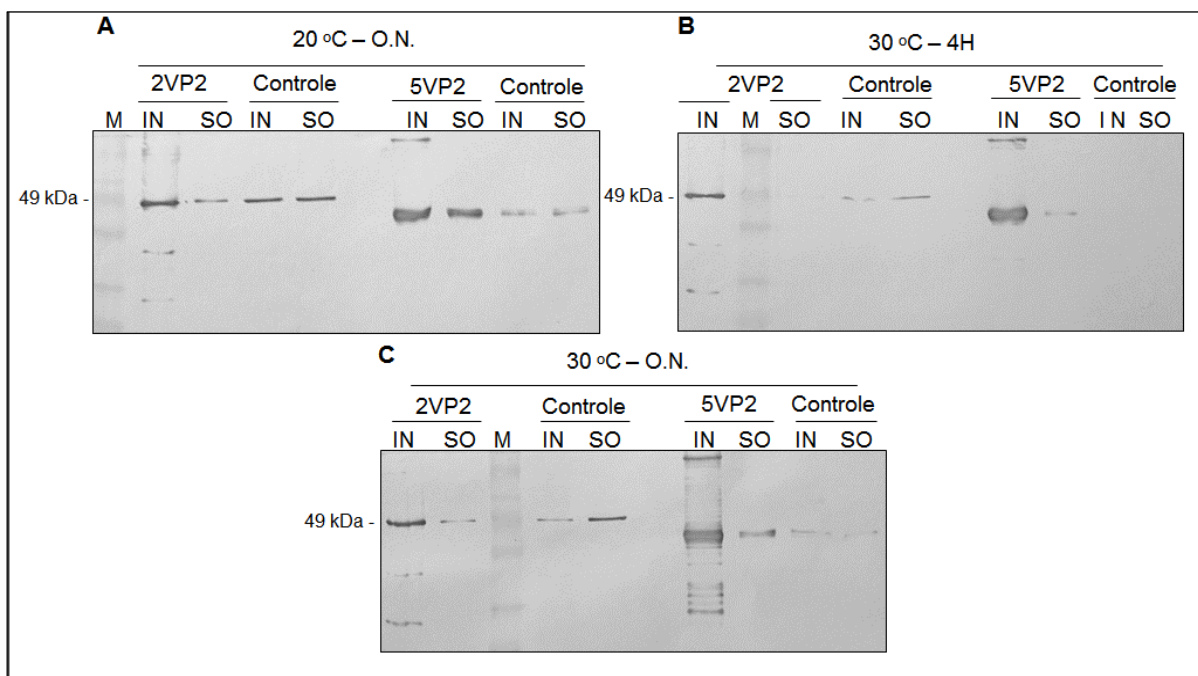
Cepa	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Concentração de IPTG (mM)	Meio de cultivo
BL21 Star	37	4	1,0 – 0,5 – 0,2	LB
	28	5	1,0 – 0,5 – 0,2	
	20	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2	
Shuffle	30	4	1,0 – 0,5 – 0,2	LB e SOC
	30	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2	
	20	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2	
	16	16 a 18	0,5	
Tuner	37	3	0,5	LB
	30	4	0,5	
	20	16 a 18	0,5	
Rosetta-gami 2	*	*	*	LB

\* Crescimento das bactérias não atingiu a D.O. mínima.



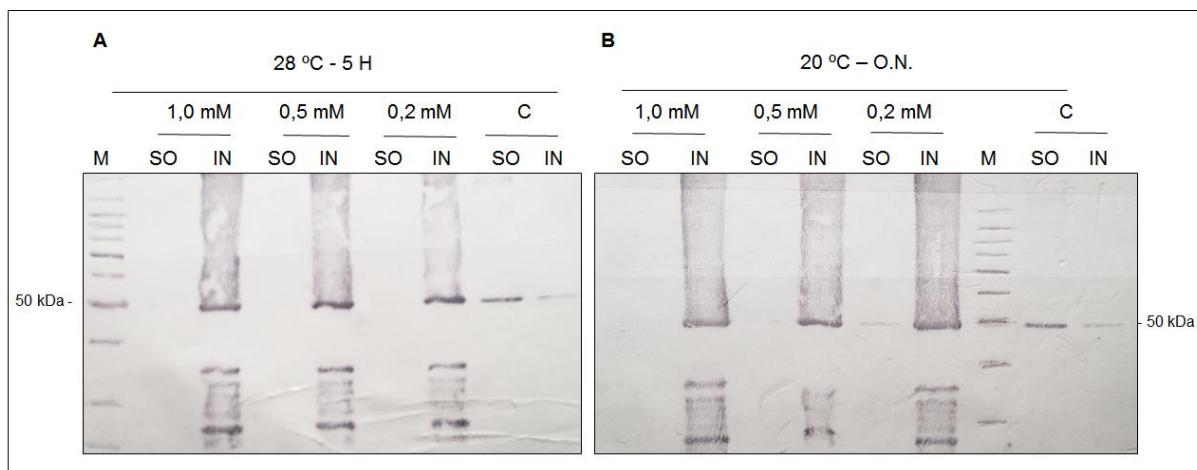
As cepas de *E. coli* BL21 Star, Shuffle e Tuner foram transformadas com o vetor recombinante e selecionadas em meio ágar LB com canamicina. As bactérias transformadas cresceram em meio LB líquido, com canamicina, até um intervalo da D.O. de 0,4 a 0,8 em temperaturas que variaram de 16 °C a 37 °C, indução por 3 horas a 18 horas e com 0,2 mM a 1 mM de IPTG. Uma amostra controle não induzido foi retirada antes do início da indução. Ao final do tempo de expressão, o inóculo foi centrifugado a 6000 xg, a 4 °C, por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise. Uma alíquota do *pellet* foi retirada para análise por SDS-PAGE para avaliar se houve a expressão da proteína. A seguir, o *pellet* foi incubado com lisozima e sonificado para lise bacteriana. As frações do *pellet* e do sobrenadante foram obtidas por centrifugação a 20000 xg, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise. Alíquotas de cada fração foram retiradas para análise por SDS-PAGE para verificar se a proteína estava sendo expressa na forma solúvel ou insolúvel, em corpos de inclusão. O rendimento das sequências de VP2 testadas (uma inteira e uma truncada) ficou abaixo do esperado em todas as condições. Não foi possível detectar a migração das bandas referentes às sequências da VP2 por SDS-PAGE, o que aconteceu somente após a transferência para membrana de nitrocelulose e revelação com fosfatase alcalina por *western blot*. Nas cepas Shuffle houve um aumento discreto do rendimento e da solubilidade a 20 °C nas amostras testadas, quando induzida por 16 a 18 horas, com 0,5 mM de IPTG (FIGURA 24).

FIGURA 24. TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VP2 COM A CEPA *E. coli* Shuffle. *WESTERN BLOT*, COM ANTICORPO ANTI-HIS. A. EXPRESSÃO DA 2VP2 E 5VP2 A 20 °C, POR 18 HORAS E 0,5 mM DE IPTG. B. EXPRESSÃO DA 2VP2 E 5VP2 A 30 °C, POR 4 HORAS E 0,5 mM DE IPTG. C. EXPRESSÃO DA 2VP2 E 5VP2 A 30 °C, POR 18 HORAS E 0,5 mM DE IPTG. M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. SO: FRAÇÃO SOÚVEL; IN: FRAÇÃO INSO-LÚVEL; CONTROLE NÃO INDUZIDO; ON: 18 HORAS DE INDUÇÃO.



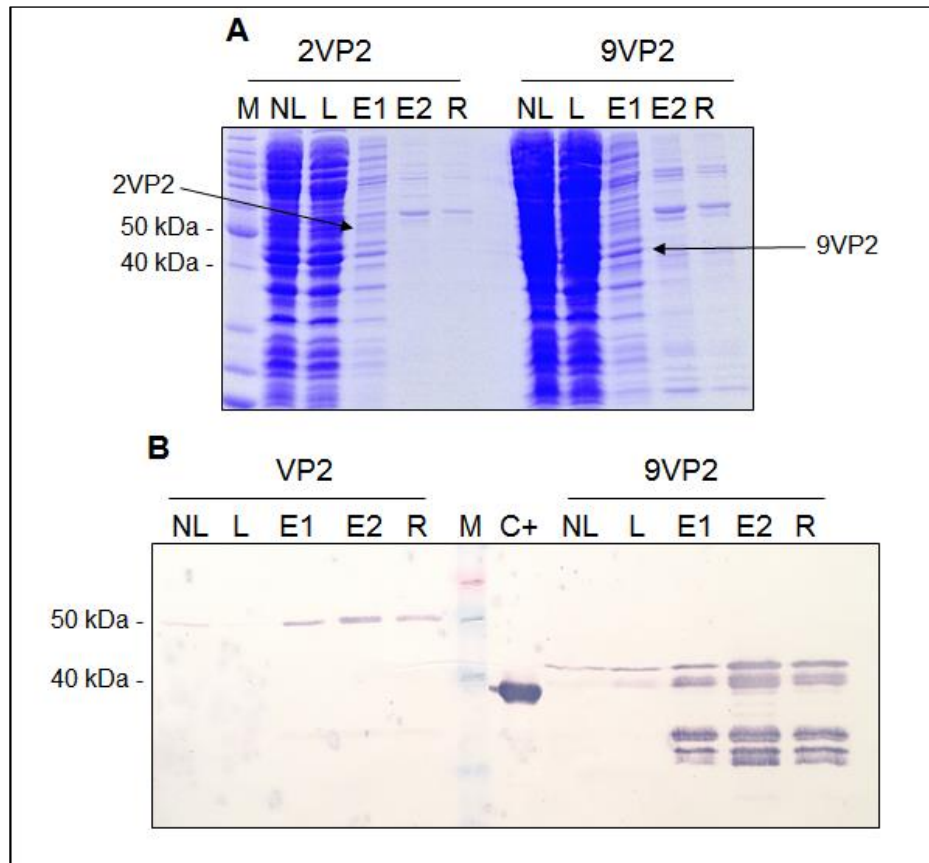
Na cepa BL21 Star não foi verificado aumento do rendimento e solubilidade nas condições testadas (FIGURA 25). A expressão basal da VP2 foi observada nas duas cepas. O rendimento também foi insatisfatório na cepa Turner. A banda referente à VP2 não foi visualizada por SDS-PAGE. Na cepa Rosetta-gami 2, a indução não pode ser realizada pois o crescimento das bactérias não atingiu a D.O. mínima. A concentração de IPTG não interferiu no rendimento e solubilização da proteína.

FIGURA 25. TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP2 COM A CEPA *E. coli* BL21 Star. *WESTERN BLOT*, COM ANTICORPO ANTI-HISTIDINA. A. EXPRESSÃO DA 2VP2 A 28 °C, POR 5 HORAS, COM 1,0 mM, 0,5 mM E 0,2 mM DE IPTG. B. EXPRESSÃO DA 2VP2 A 20 °C, POR 18 HORAS, COM 1,0 mM, 0,5 mM E 0,2 mM DE IPTG. M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. SO: FRAÇÃO SOLÚVEL; IN: FRAÇÃO INSOLÚVEL; CONTROLE NÃO INDUZIDO; ON: 18 HORAS DE INDUÇÃO.



Um experimento em larga escala da VP2 com 1L de indução foi conduzido com a cepa Shuffle, a 16 °C, por 18 horas, com 0,5 mM de IPTG, em meio SOC, na tentativa de obter mais proteína. As células foram recuperadas por sedimentação a 6000 xg, 4 °C, e o *pellet* de bactérias foi solubilizado em tampão de lise. A lise bacteriana foi realizada em microfluidificador. As frações *pellet* e sobrenadante foram separadas por centrifugação a 20000 xg, a 4 °C, por 30 minutos, seguida de mais uma etapa de ultracentrifugação a vácuo a 50000 xg, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o sedimento foi ressuscitado em tampão de lise. Aliquotas de cada fração foram retiradas para análise por SDS-PAGE. As frações foram armazenadas na câmara fria a 4 °C em embalagem com gelo. A seguir, a proteína foi purificada em resina de níquel. Aliquotas de cada etapa da purificação foram retiradas para análise por SDS-PAGE. No entanto, apesar do alto volume de indução, o rendimento da VP2 ainda foi insuficiente (FIGURA 26). Considerando as dificuldades para expressão da VP2 na forma solúvel para obter sua conformação correta, os testes com a VP2 foram interrompidos.

FIGURA 26. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP2 COM A CEPA *E. coli* Shuffle EM LARGA ESCALA. A. PERFIL DE SDS-PAGE; B. WESTERN BLOT, COM ANTICORPO ANTI-HISTIDINA, DO TESTE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS 2VP2 E 5VP2 PURIFICADAS POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL A 20 °C, OVERNIGHT, 0,5 mM DE IPTG. M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. NL: FRAÇÃO NÃO LIGADA; L: FRAÇÃO LAVADO; E1: PRIMEIRA ELUIÇÃO; E2: SEGUNDA ELUIÇÃO R: RETIDO NA RESINA; C+: CONTROLE POSITIVO DO WESTERN BLOT.



## 5.7.2 Proteína VP3

### 5.7.2.1 Indução

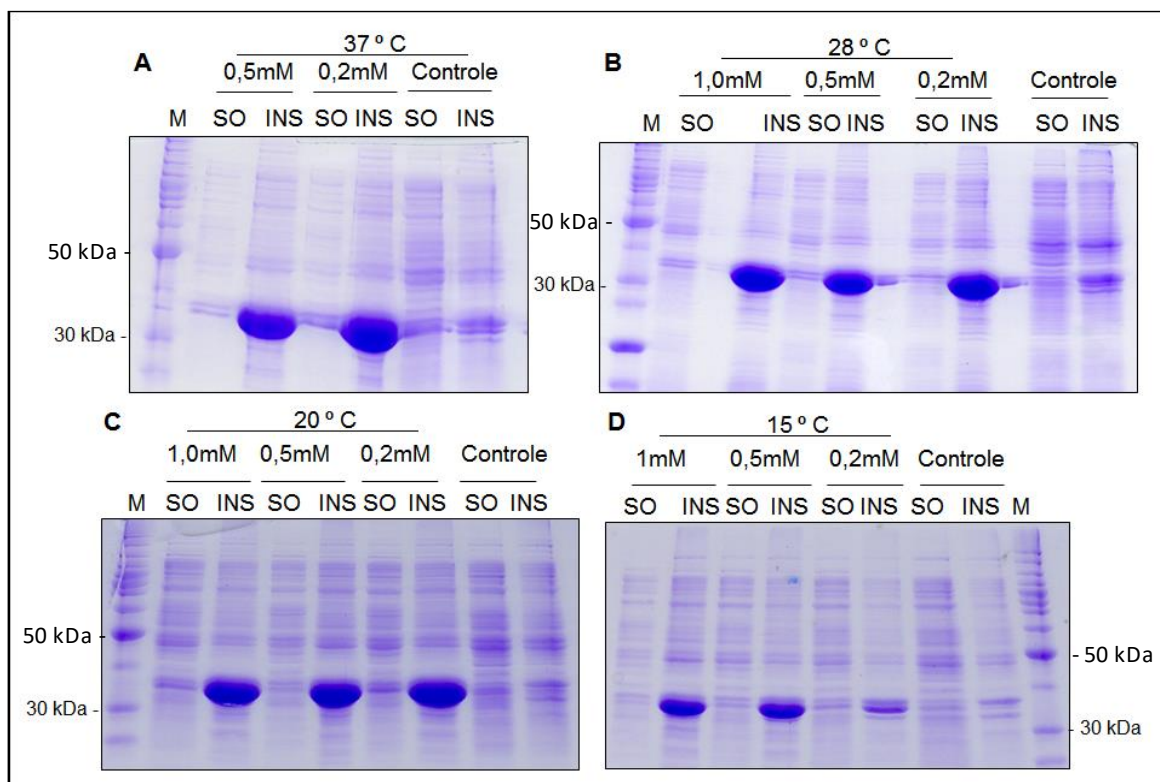
A expressão da VP3 foi obtida com a cepa BL21 Star e solubilizada em corpos de inclusão. Para otimizar a expressão foram testados diferentes protocolos de temperatura, tempo de expressão e concentração de IPTG (TABELA 5).

TABELA 5. TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VP3 EM *E. coli*.

Cepa	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Concentração de IPTG (mM)
BL21 Star	37	1 a 4	1,0 – 0,5 – 0,2
	28	5	1,0 – 0,5 – 0,2
	20	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2
	15	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2
Turner pLysS	37	3	0,5
	30	4	0,5
	20	16 a 18	0,5

Células de *E. coli* BL21 Star foram transformadas com o clone recombinante e selecionadas em meio ágar LB com canamicina. As bactérias transformadas cresceram em meio LB líquido, com canamicina, até um intervalo da D.O. de 0,4 a 0,8, em 37 °C/ 1 a 4 horas /0,2-0,5-1,0 mM de IPTG, 28 °C/ 5 horas /0,2-0,5-1,0 mM de IPTG, 20 °C/ 16 a 18 horas /0,2-0,5-1,0 mM de IPTG e 15 °C/ 16 a 18 horas /0,2-0,5-1,0 mM de IPTG (FIGURA 27). Uma amostra controle não induzido foi retirada antes do início da indução. Após o término do tempo de indução, as células foram recuperadas por sedimentação a 6000 x g, 4 °C, por 10 minutos o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise. Aliquotas foram retiradas para análise por SDS-PAGE. A seguir, o extrato foi incubado com lisozima e sonificado para lise bacteriana. As frações do *pellet* e do sobrenadante foram separadas por centrifugação a 20000 x g, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise. Aliquotas de cada fração foram retiradas para análise por SDS-PAGE. Nas condições testadas a VP3 foi obtida em corpos de inclusão. A concentração de IPTG não interferiu no rendimento e solubilidade da proteína. Um ensaio de expressão da VP3 foi conduzido com a cepa Turner pLysS nas seguintes condições: 20 °C / 16 a 18 horas, 30 °C / 4 horas e 37 °C / 3 horas, com 0,5 mM de IPTG. A VP3 foi expressa na forma insolúvel e com menor rendimento se comparado com a expressão na BL21 Star na condição de 37 °C / 4 horas. Considerando a presença de epítopos lineares na VP3 e a possibilidade da proteína na condição desnaturada ser reconhecida pelos anticorpos, os ensaios foram continuados com a expressão na cepa BL21 Star, a 37 °C, por 4 horas de indução e com 0,5 mM de IPTG.

FIGURA 27. TESTE DE EXPRESSÃO DA VP3 COM A CEPA E. coli BL21 Star. PERFIL DO GEL DE POLIACRILAMIDA DA INDUÇÃO DA VP3 EM DIFERENTES TEMPERATURAS, TEMPOS DE EXPRESSÃO E CONCENTRAÇÕES DE IPTG. A. EXPRESSÃO A 37 °C, POR 4 HORAS E 0,2 mM E 0,5 mM DE IPTG; B. EXPRESSÃO A 28 °C, POR 5 HORAS E 0,2 mM A 1,0 mM DE IPTG; C. EXPRESSÃO A 20 °C, POR 18 HORAS E 0,2 mM A 1,0 mM DE IPTG; D. EXPRESSÃO A 15 °C, POR 18 HORAS E 0,2 mM A 1,0 mM DE IPTG. M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. SO: FRAÇÃO SOÚVEL; IN: FRAÇÃO INSOLÚVEL; CONTROLE NÃO INDUZIDO.



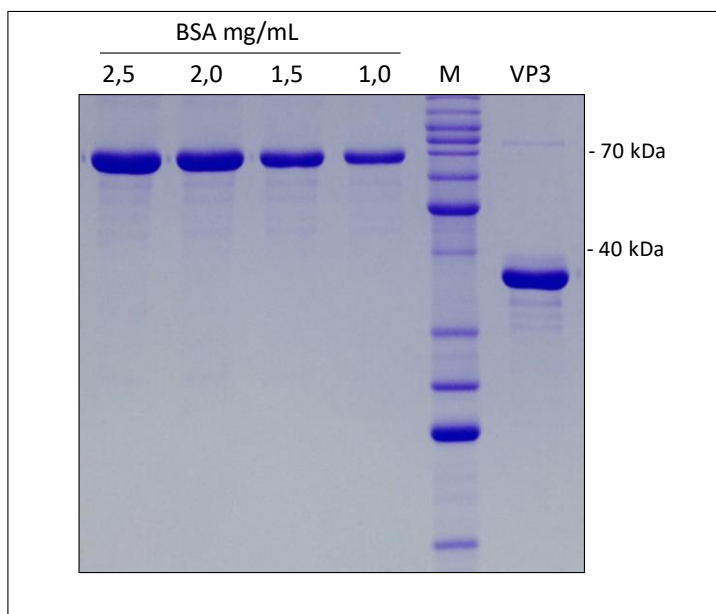
### 5.7.2.2 Solubilização da VP3 e purificação

Após a separação das frações solúvel e insolúvel, a proteína VP3 foi submetida à lavagem dos corpos de inclusão. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise e submetido a mais uma etapa de sonicação, seguida por três etapas de lavagem dos corpos de inclusão. Foram realizados testes com tampões de solubilização contendo 1 M, 2 M e 8 M de ureia. A proteína foi recuperada dos corpos de inclusão com 2 M de ureia.

A proteína solubilizada em 2 M de ureia foi purificada por afinidade em resina de níquel, uma vez que a proteína foi expressa fusionada a uma cauda de histidina. A resina foi primeiramente equilibrada com o tampão de lavagem com 2 M de ureia. A proteína diluída em tampão de lise com 5 mM de imidazol foi adicionada ao tubo

contendo a resina e incubada por duas horas para ligação. Para estabelecer o protocolo de lavagem dos corpos de inclusão foram testadas concentrações de 5 a 80 mM de imidazol. A partir de 10 mM de imidazol a proteína foi eluída nas lavagens. Foi estabelecido 5 mM de imidazol no tampão de ligação para lavagens. A etapa da eluição foi testada com tampão de eluição com 250 e 500 mM de imidazol e 2 M de ureia. A melhor eluição foi estabelecida na concentração de 500 mM. Foram retiradas alíquotas de cada etapa para análise por SDS-PAGE. A proteína purificada foi quantificada através da comparação de uma curva padrão de BSA por SDS-PAGE (FIGURA 28). O ensaio de *western blot*, com o anticorpo anti-histidina e revelação com fosfatase alcalina, foi utilizado para confirmar a expressão da VP3. Nas condições testadas, a partir de um inóculo de 50 mL, o rendimento da VP3 foi de 5 mg/mL.

FIGURA 28. QUANTIFICAÇÃO DA VP3 ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO COM A CURVA DE BSA. M: PERFIL DE CORRIDA EM GEL DE POLIACRILAMIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. QUANTIFICAÇÃO DA VP3: 2,0 mg/mL.



### 5.7.3 Fragmentos da VP3 fusionados à GFP

#### 5.7.3.1 Indução

Os fragmentos 1 ao 7 fusionados à GFP foram obtidos solúveis na cepa BL21 Star. Para otimizar a expressão foram testados diferentes protocolos de temperatura, tempo de expressão e concentração de IPTG (TABELA 6).

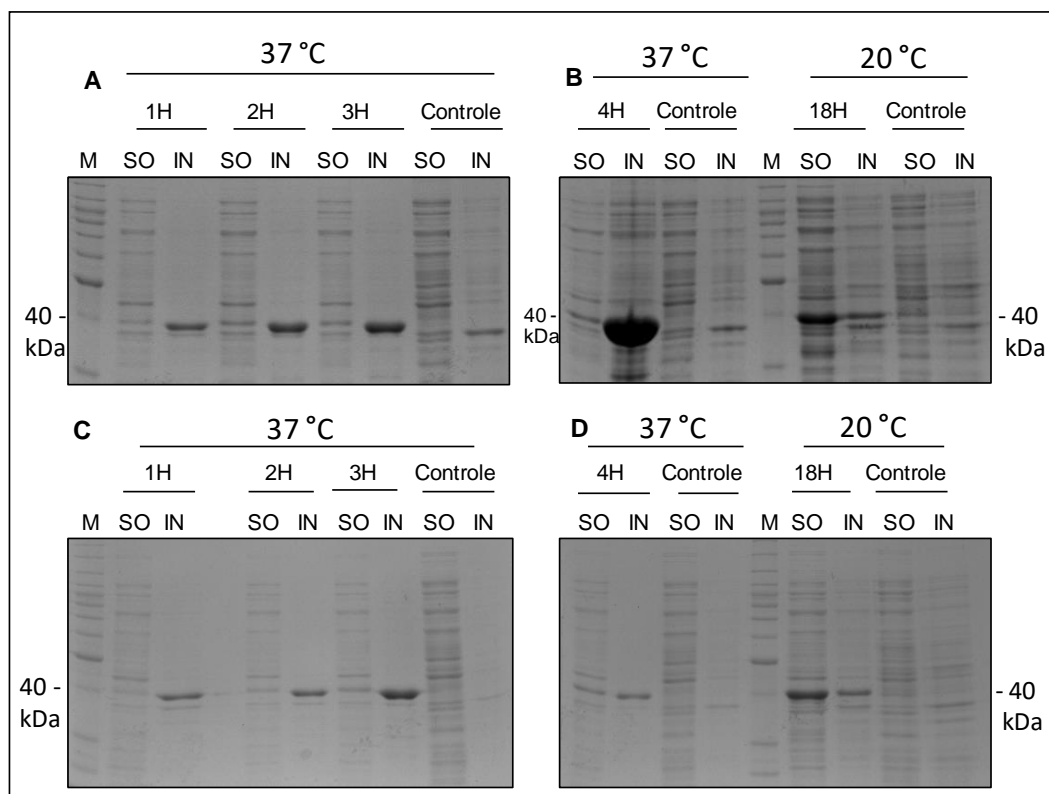
TABELA 6. TESTE DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS 1 AO 7 DA PROTEÍNA VP3 EM *E. coli*.

Cepa	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Concentração de IPTG (mM)
BL21 Star	37	1 a 4	1,0 – 0,5 – 0,2
	28	5	1,0 – 0,5 – 0,2
	20	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2
	15	16 a 18	1,0 – 0,5 – 0,2
Turner pLysS	37	3	0,5
	30	4	0,5
	20	16 a 18	0,5

Células de *E. coli* BL21 Star foram transformadas com o clone recombinante dos fragmentos. As bactérias foram selecionadas em meio ágar LB com canamicina e cresceram em meio LB líquido com canamicina até um intervalo da D.O. de 0,4 a 0,8, nas temperaturas de 37 °C, 28 °C, 20 °C e 15 °C, por 4, 5 e 18 horas e com 0,2, 0,5 e 1,0 mM de IPTG. Uma amostra controle não induzido foi retirado antes do início da indução. Quando aplicável, alíquotas foram retiradas a cada hora, para verificar quantitativamente a expressão ao longo do tempo. Após o término do tempo de indução, as células foram recuperadas por sedimentação a 6000 xg, 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuspensionado em tampão de lise. Alíquotas foram retiradas para análise por SDS-PAGE. A seguir, o extrato foi incubado com lisozima e sonificado para lise bacteriana. As frações do *pellet* e do sobrenadante foram separadas por centrifugação a 20000 x g, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise. Alíquotas de cada fração foram retiradas para análise por SDS-PAGE. Os fragmentos foram obtidos nas temperaturas de 20 °C e 15 °C, em menor quantidade nesta última temperatura. A concentração de IPTG não interferiu no rendimento e solubilidade da proteína. O protocolo escolhido para expressão dos fragmentos foi a indução a 20 °C, por 16 a 18 horas, 0,5 mM de IPTG. Com a cepa Turner pLysS a expressão foi testada nas seguintes condições: 20 °C/16 a 18 horas, 30 °C/4 horas e 37 °C /3 horas, com 0,5 mM de IPTG. O fragmento foi obtido na fração solúvel com menor rendimento que na BL21 Star. A figura 29 ilustra a expressão dos fragmentos 4 e 7 avaliada nas temperaturas de 37 °C e 20 °C, durante 4 e 18 horas, com 0,5 mM de IPTG. Após as induções os extratos apresentaram a cor esverdeada da GFP confirmando a expressão das proteínas.



FIGURA 29. TESTE DE EXPRESSÃO DE F4 E F7 EM *E. coli* BL21 Star. PERFIL DOS FRAGMENTOS F4 E F7 POR SDS-PAGE, COM DIFERENTES TEMPERATURAS, TEMPOS DE EXPRESSÃO E CONCENTRAÇÕES DE IPTG. A. EXPRESSÃO DO F4 A 37 °C, POR 1 A 3 HORAS E 0,5 mM DE IPTG; B. EXPRESSÃO DO F4 A 37 °C/4 HORAS, 20 °C/18 HORAS E 0,5 mM DE IPTG; C. EXPRESSÃO DO F7 A 37 °C, POR 1 A 3 HORAS E 0,5 mM DE IPTG; D. EXPRESSÃO DO F7 A 37 °C/4 HORAS, 20 °C/18 HORAS E 0,5 mM DE IPTG; M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. SO: FRAÇÃO SOLÚVEL; IN: FRAÇÃO INSOLÚVEL; CONTROLE NÃO INDUZIDO.

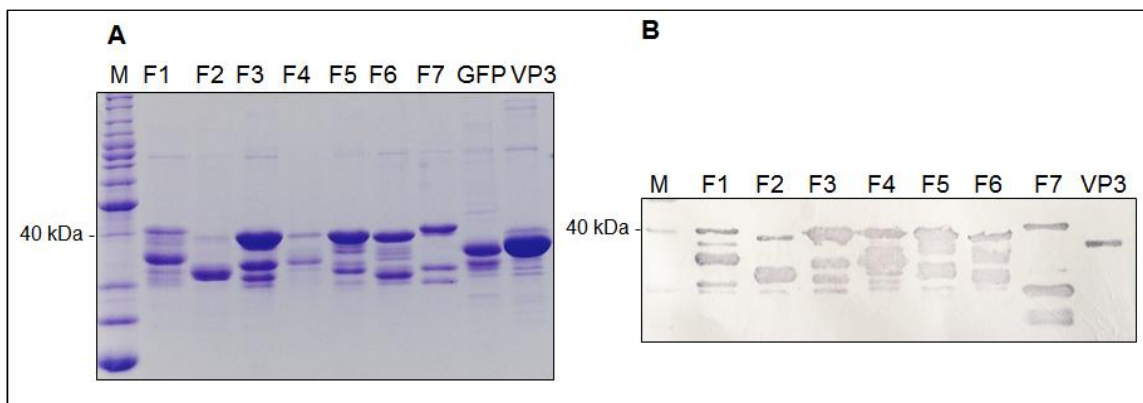


### 5.7.3.2 Purificação

Os fragmentos foram purificados por afinidade em resina de níquel. A resina foi primeiramente equilibrada com o tampão de lavagem. As proteínas previamente solubilizadas em tampão de lise com 5 mM de imidazol foram incubadas, no gelo, sob agitação por duas horas para ligação com a resina. Quatro etapas seguidas de lavagens da resina foram realizadas. As proteínas foram eluídas com 500 mM de imidazol duas vezes. Foram retiradas alíquotas de cada etapa para análise por SDS-PAGE. Os fragmentos purificados foram quantificados por espectrofotometria. O ensaio de *Western blot*, com o anticorpo anti-his, foi realizado para confirmar a expressão dos fragmentos (FIGURA 30).

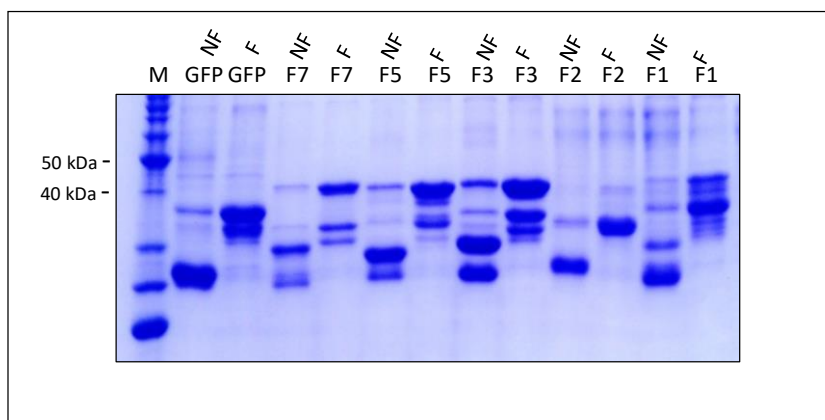
FIGURA 30. PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL DOS FRAGMENTOS 1 AO 7 DA PROTEÍNA VP3.

A. PERFIL DOS FRAGMENTOS 1 A 7, DA GFP E DA VP3 INTEIRA PURIFICADOS POR SDS-PAGE. B. *WESTERN BLOT*, COM ANTICORPO ANTI-HISTIDINA, DOS FRAGMENTOS 1 A 7 E VP3 INTEIRA PURIFICADOS. M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR.



Os extratos dos fragmentos expressos a 20 °C apresentaram-se esverdeados devido à fusão da GFP. No gel de poliacrilamida foram observadas bandas correspondentes ao peso molecular dos fragmentos e outras bandas migraram no gel, indicando moléculas de menor peso molecular (FIGURA 30). Este comportamento foi repetido após a transferência para a membrana de nitrocelulose e revelação com anticorpo anti-histidina por *western blot*. Segundo Aoki et al. (1999) a GFP não é completamente desnaturada pelo SDS levando a diferentes conformações da proteína que migra em diferentes posições no gel. Para investigar se os fragmentos fusionados à GFP não estavam totalmente desnaturados no gel de poliacrilamida, alíquotas dos fragmentos foram diluídas em tampão de amostra para SDS-PAGE (4X), submetidas ou não à fervura a 95 °C, por 5 minutos e analisadas por SDS-PAGE. Verificou-se nas duas condições, com fervura e sem fervura, padrões diferentes das bandas que podem ser um indicativo de maior ou menor grau de desnaturação das moléculas (FIGURA 31). Outros testes devem ser realizados para elucidar a desnaturação dos fragmentos fusionados à GFP por SDS-PAGE e a possibilidade de degradação dessas proteínas.

FIGURA 31. DESNATURAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA VP3 FUSIONADOS À GFP POR SDS-PAGE. F: FRAGMENTOS SUBMETIDOS À FERVURA A 95 °C, POR 5 MINUTOS; NF: FRAGMENTOS NÃO SUBMETIDOS À FERVURA; M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR.



#### 5.7.4 Fragmentos da VP3 não fusionados à GFP (FA, FM, FP)

##### 5.7.4.1 Indução

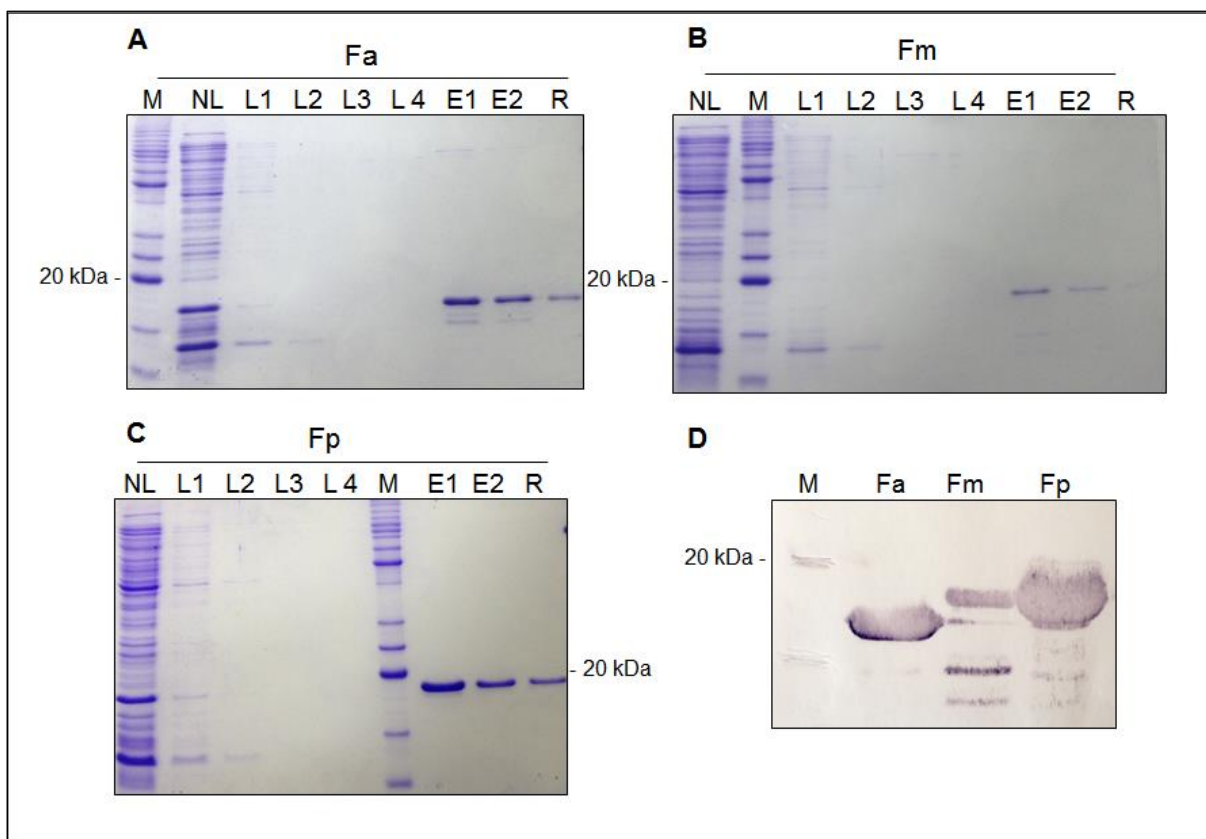
Os fragmentos da VP3 não fusionados à GFP foram obtidos na fração solúvel na cepa BL21 Star. O protocolo de expressão foi testado com diferentes temperaturas e tempos de expressão.

*E. coli* BL21 Star foram transformadas com o clone recombinante e selecionadas em meio ágar LB com canamicina. As bactérias transformadas cresceram em meio LB líquido, com canamicina, até um intervalo da D.O. de 0,4 a 0,8, a 37 °C e 20 °C, durante 4 e 18 horas, com 0,5 mM de IPTG. Uma amostra controle não induzido foi retirada antes do início da indução. Após o término do tempo de indução, as células foram recuperadas por sedimentação a 6000 xg, 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuspensionado em tampão de lise. Alíquotas foram retiradas para análise por SDS-PAGE. A seguir, o extrato foi incubado com lisozima e sonificado para lise bacteriana. As frações do *pellet* e do sobrenadante foram separadas por centrifugação a 20000 xg, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise. Alíquotas de cada fração foram retiradas para análise por SDS-PAGE. Os fragmentos sem GFP solúveis foram obtidos a 20 °C, induzidos por 18 horas com 0,5 mM de IPTG.

#### 5.7.4.2 Purificação

Os fragmentos foram purificados por afinidade em resina de níquel como no item 5.7.3.2. (FIGURA 32). No teste de ELISA, realizado na sequência, os fragmentos foram desnaturados com 2 M de ureia para serem avaliados nas mesmas condições da proteína VP3 inteira.

FIGURA 32. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS ANTERIOR, MÉDIO E POSTERIOR DA VP3. PERFIL EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS INDUZIDOS A 20 °C, POR 18 HORAS E 0,5 mM IPTG. A. FRAGMENTO ANTERIOR; B. FRAGMENTO MÉDIO; C. FRAGMENTO POSTERIOR; D. *WESTERN BLOT*, COM ANTICORPO ANTI-HISTIDINA DOS FRAGMENTOS ANTERIOR, MÉDIO E POSTERIOR PURIFICADOS. M: PERFIL DE CORRIDA DO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR. NL: FRAÇÃO NÃO LIGADA; L: FRAÇÃO LAVADO; E1: PRIMEIRA ELUIÇÃO; E2: SEGUNDA ELUIÇÃO R: RETIDO NA RESINA.



## 5.8 SOROS

Não tivemos acesso a um painel sorológico comercial. Os soros do painel utilizado neste estudo são de animais imunizados vacinados ou com anticorpos maternos, de animais não vacinados de criação doméstica, de animais com *status* vacinal desconhecido e de animais *naïve*, provenientes de várias fontes. Obtivemos amostras de granjas comerciais através de contatos diretos com a indústria ou por intermédio do Centro de Diagnóstico Marcus Enrietti (Curitiba – PR), criadores domésticos e da Universidade Federal do Paraná. Os soros foram avaliados pelo teste comercial IdexxIBD Ab Test®. A utilização do teste comercial, ao invés do teste de vírus neutralização, considerado o padrão-ouro, deve-se à falta de disponibilidade para execução desse teste no laboratório onde foi conduzido o estudo. Os soros de animais *naïve* não foram analisados.

## 5.9 SLOT BLOT

Os primeiros testes de ELISA para avaliar os antígenos recombinantes foram revelados com fosfatase alcalina. Os resultados não foram promissores apresentando sinais muito fracos com densidades óticas em torno de 0,1. Como alternativa os antígenos foram testados com o *slot blot* revelado por quimioluminescência por ser um método de revelação sensível, de leitura visual e utilização de instrumentos simples.

As amostras de soros foram testadas com o teste comercial Idexx IBD Ab Test®. O protocolo do *slot blot* com a proteína VP3 foi testado com dois soros positivos e o controle negativo (SPF) do kit comercial. Os soros foram diluídos em 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:8000 e 1:10000 e utilizados diferentes tempos de exposição do filme: 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 e 15 minutos. A diluição 1:40000 do anticorpo secundário foi utilizado conforme indicação do fabricante e a quantidade de proteína aplicada foi de 500ng. O protocolo foi estabelecido com soro diluído 1:5000 e tempo de exposição de 5 minutos (TABELA 7; FIGURA 33).

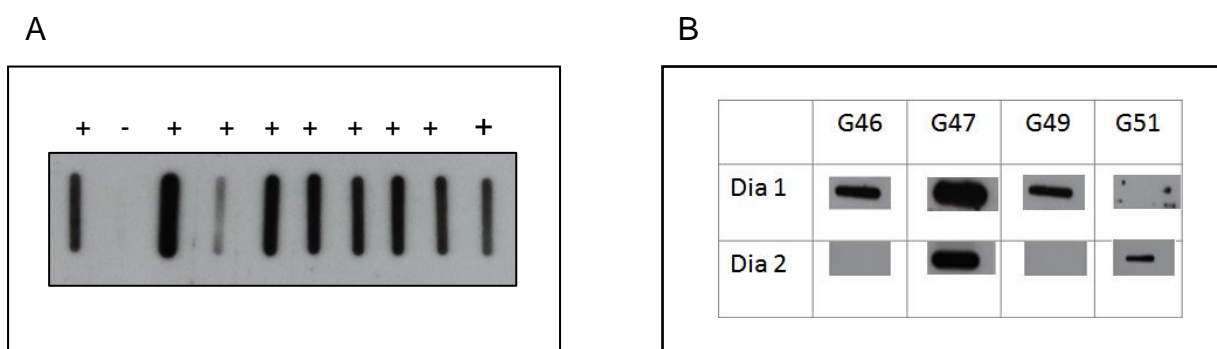
TABELA 7. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE 137 SOROS ANALISADOS COM O TESTE COMERCIAL E A PROTEÍNA VP3 RECOMBINANTE NO *SLOT BLOT*.

Grupo total	Com (+)	Com (-)	Total
Slot (+)	125	8	133
Slot (-)	2	2	4
Total	127	10	137

Nos testes realizados com os fragmentos 1 ao 7 da VP3, com o mesmo protocolo, verificou-se falta de repetitividade de resultados com alguns soros positivos para IBD com o teste comercial. Os testes não foram continuados (FIGURA 33).

FIGURA 33. *SLOT BLOT* REVELADO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA.

A. REATIVIDADE DA PROTEÍNA VP3 COM 10 AMOSTRAS DE SOROS DE ANIMAIS VACINADOS;  
B. REATIVIDADE DO FRAGMENTO 7 TESTADA EM DIAS DIFERENTES COM AMOSTRAS DE 4 SOROS DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM ANTICORPOS MATERNOS.



## 5.10 TESTE DE ELISA

Os resultados foram obtidos com o teste de ELISA revelado com peroxidase. O painel sorológico foi testado com o kit comercial Idexx IBD Ab Test® (TABELA 8).

TABELA 8. RESULTADOS DOS SOROS TESTADOS COM O TESTE COMERCIAL Idexx IBD Ab Test®.

Soros	D.O. <sup>a</sup>	A/P <sup>b</sup>	Resultados <sup>c</sup>	Soros	D.O.	A/P	Resultados
NC	0,5	1,69	1	G47	0,59	2,06	1
NG	0,07	0,04	0	G48	0,59	2,07	1
G1	0,5	1,72	1	S1	0,08	0,10	0
G2	0,28	0,84	1	S3	0,07	0,05	0
G3	0,61	2,14	1	S4	0,08	0,07	0
G4	0,55	1,89	1	S5	0,07	0,06	0
G6	0,91	3,30	1	S7	0,07	0,04	0
G7	0,27	0,83	1	S8	0,07	0,03	0
G8	0,46	1,54	1	S9	0,08	0,09	0
G9	0,87	3,14	1	ME33	0,4	1,74	1
G10	0,27	0,81	1	ME34	0,4	1,71	1
G11	0,97	3,52	1	ME39	1,05	4,83	1
G12	0,45	1,53	1	ME86	1,05	4,83	1
G13	0,61	2,12	1	ME88	1	4,62	1
G14	0,89	3,21	1	ME98	0,36	1,30	1
G15	0,46	1,53	1	ME158	0,32	1,14	1
G16	0,25	0,74	1	ME178	1,11	4,38	1
G17	0,39	1,27	1	ME185	0,54	2,07	1
G18	0,93	3,36	1	ME186	0,42	1,70	1
G19	0,17	0,44	1	ME195	0,42	1,70	1
G20	0,78	2,80	1	ME204	0,49	2,01	1
G21	0,45	1,53	1	ME208	0,63	2,67	1
G22	0,99	3,60	1	ME211	0,68	2,93	1
G23	1,03	3,76	1	ME214	0,63	2,70	1
G24	0,37	1,19	1	ME219	0,46	1,89	1
G25	0,47	1,60	1	ME222	0,71	3,07	1
G26	0,37	1,19	1	ME223	1,21	5,37	1
G27	0,23	0,67	1	ME227	0,74	3,20	1
G28	0,84	3,03	1	ME228	0,56	2,34	1
G29	0,35	1,14	1	ME241	1,02	4,50	1
G30	0,41	1,34	1	ME245	1,16	5,17	1
G31	0,53	1,83	1	ME248	0,74	3,21	1
G32	0,27	0,82	1	ME251	0,73	3,14	1
G33	0,89	3,20	1	ME254	1,05	4,64	1
G34	0,56	1,95	1	ME262	1,03	4,55	1
G35	0,37	1,20	1	ME263	0,72	3,08	1
G36	0,49	1,69	1	ME265	1,27	5,69	1
G37	0,89	3,22	1	ME266	0,69	2,96	1
G38	0,55	1,91	1	ME267	0,67	2,85	1
G41	0,26	0,78	1	ME275	0,48	1,98	1
G42	0,47	1,61	1	ME276	0,53	2,21	1
G43	0,21	0,59	1	ME287	0,43	1,88	1
G44	0,21	0,58	1	ME321	1,14	5,47	1
G46	0,47	1,58	1	ME340	1,03	4,91	1

a: densidade ótica

b: D.O.amostra - D.O. controle negativo/D.O.controle positivo - D.O. controle negativo

c: soros negativos (0); soros positivos (1)

Soros NC e NG: soros de animais com *status* vacinal desconhecido

Soros G1 a G48: soros de animais de 1 dia.

Soros S1 a S9: soros de animais não vacinados

Soros ME33 a ME340: soros de animais vacinados

### 5.10.1 Padronização do protocolo do teste de ELISA com a rVP3

Para estabelecer o protocolo do teste de ELISA foram selecionadas no total 8 amostras testadas com o kit comercial de soros negativos, fracos positivos e fortes positivos testadas com o kit comercial. Diferentes diluições do soro (1:100 e 1:500) e do conjugado (1:10000, 1:20000, 1:40000) foram avaliadas. A placa foi sensibilizada com diferentes quantidades de proteína recombinante de 25 a 2000 ng/100  $\mu$ L (0,25 a 2  $\mu$ g/mL). O controle negativo do kit comercial foi utilizado e identificado como amostra 1. A amostra 2 foi testada no teste referência com resultado negativo. As amostras 3, 4 e 5 apresentaram sinais fracos positivos e as amostras 6, 7 e 8 fortes positivos no teste comercial. (FIGURAS 34, 35 e 36). A melhor condição de anticorpo secundário para testar os soros foi estabelecida na diluição 1:40000, onde a diferença entre os soros fortes positivos (6, 7 e 8) e os negativos (1e 2) ficou bem estabelecida e a D.O. do soro muito positivo (6) atingiu no máximo 2. Nas diluições do soro 1:100 ou 1:500 não foi possível verificar um padrão de resposta semelhante ao do teste comercial. As amostras 5, 7 e 8 apresentaram as respostas mais próximas do teste comercial na diluição 1:100, enquanto as amostras 2, 3 e 6 apresentaram na diluição 1:500. A diluição do soro não interferiu na resposta da amostra 4. Selecionamos a diluição 1:500 pois foi a mesma diluição utilizada no teste comercial (FIGURA 36).

FIGURA 34. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:10000. DILUIÇÃO DOS SOROS 1:100 E 1:500. QUANTIDADE DE ANTÍGENO DE 25 A 2000 ng/POÇO (0,25 A 2  $\mu$ g/mL). COM: TESTE COMERCIAL.

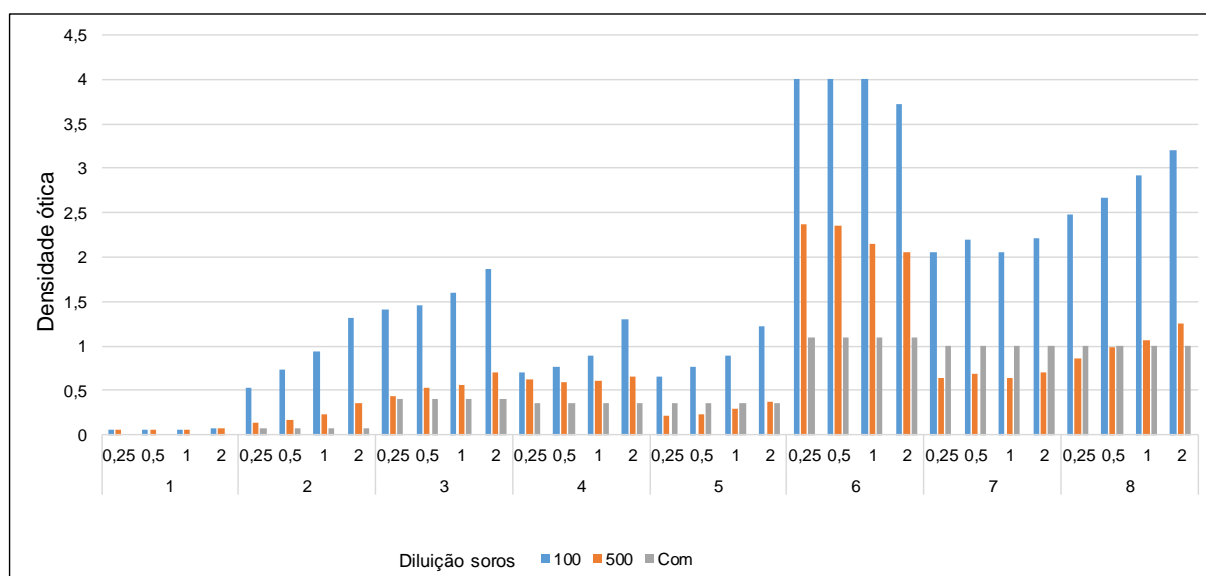




FIGURA 35. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:20000. DILUIÇÃO DOS SOROS 1:100 E 1:500. QUANTIDADE DE ANTÍGENO DE 25 A 2000 ng/POÇO (0,25 A 2 µg/mL). COM: TESTE COMERCIAL

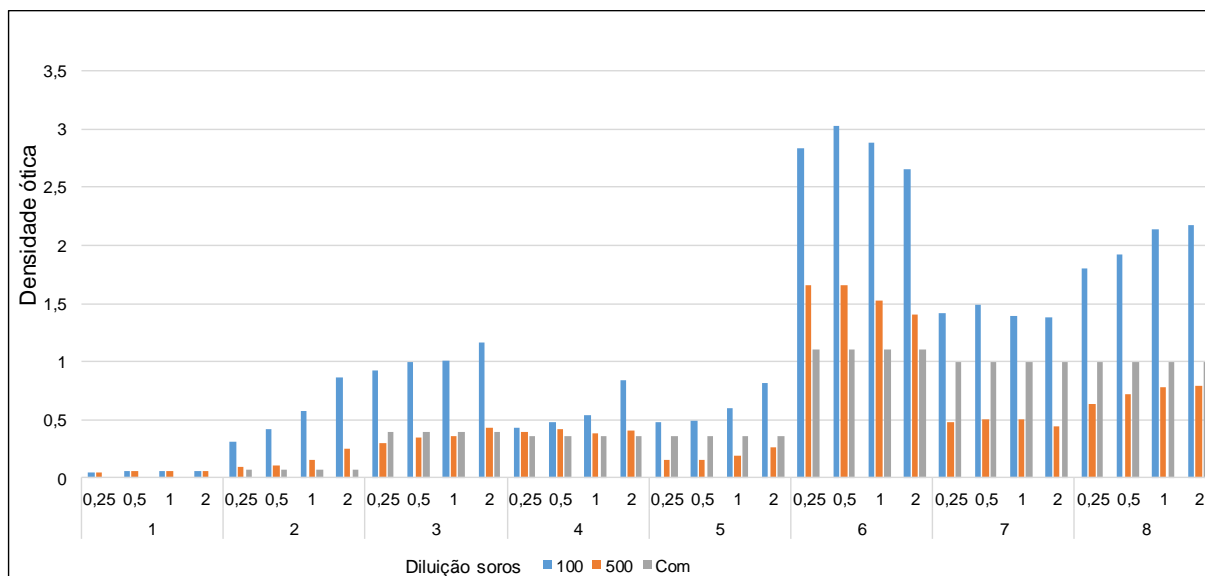
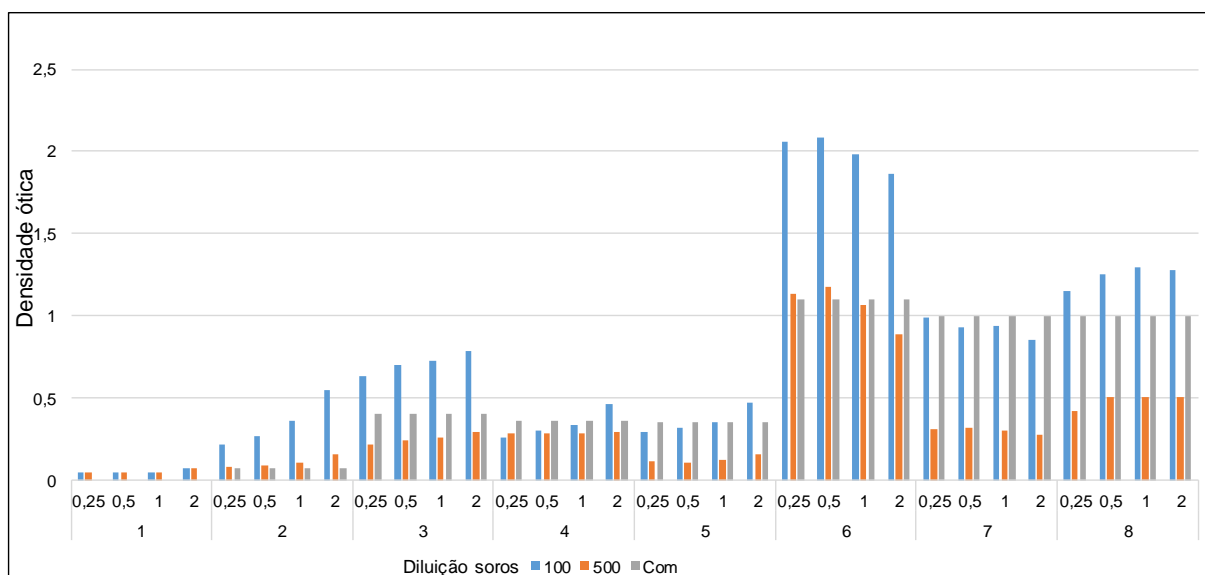


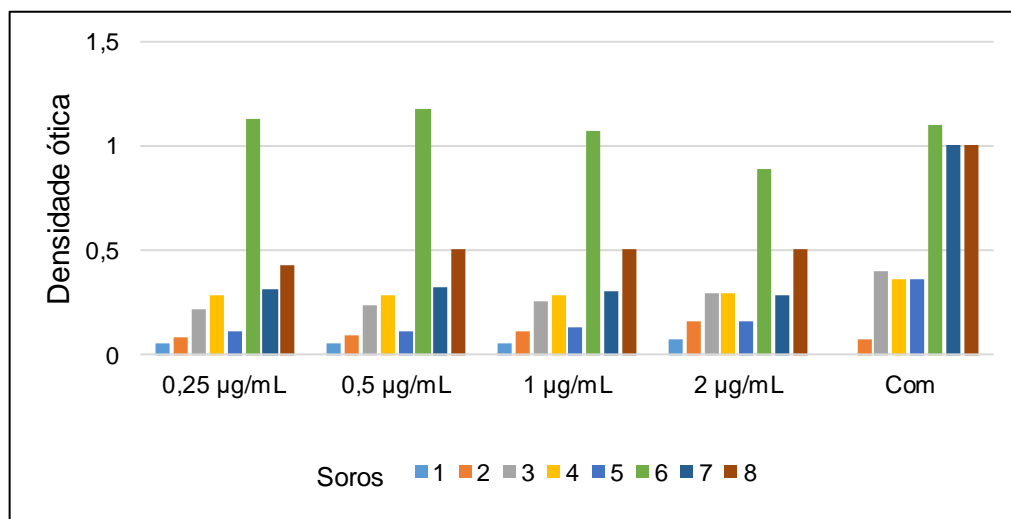
FIGURA 36. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:40000. DILUIÇÃO DOS SOROS 1:100 E 1:500. QUANTIDADE DE ANTÍGENO DE 25 A 2000 ng/POÇO (0,25 A 2 µg/mL). COM: TESTE COMERCIAL.



As reações dos soros analisados frente às diferentes concentrações testadas do antígeno foram similares. Os soros 3, 5, 7 e 8 foram menos reativos no teste com a rVP3 que no teste comercial em todas as condições testadas. Os resultados de

reatividade foram discretamente melhores com 50 ng/poço de antígeno e, por isso foi escolhida para sensibilizar as placas (FIGURA 37).

FIGURA 37. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 CONTRA OS SOROS NEGATIVOS (1 E 2), FRACOS POSITIVOS (3, 4, E 5) E FORTES POSITIVOS (6, 7 E 8). CONDIÇÕES TESTADAS: DILUIÇÃO DO ANTICORPO SECUNDÁRIO 1:40000; DILUIÇÃO DOS SOROS 1:500; QUANTIDADE DE ANTÍGENO DE 25 A 2000 ng/POÇO (0,25 A 2 µg/ml). COM: TESTE COMERCIAL.



### 5.10.2 Teste de elisa com a rVP3

Uma vez estabelecido o protocolo as placas foram sensibilizadas com 50 ng/poço de antígeno, os soros foram testados em triplicata na diluição 1:500 e o anti-corpo secundário foi diluído 1:40000. O controle positivo foi testado com o teste comercial e apresentou uma reação positiva fraca. Como controle negativo foi utilizado um soro naíve. O perfil do painel sorológico consistiu de 35 animais vacinados, 44 animais de 1 dia de idade imunizados com anticorpos maternos, 7 soros de animais não vacinados de criador doméstico, 2 soros de animais com *status* vacinal desconhecido e 19 soros de animais naíve. Os resultados obtidos foram expressos como índice A/P, definido pelo fabricante do kit comercial, de acordo com a fórmula:

$$A/P^* = \frac{\text{Média da D.O.** da amostra} - \text{média da D.O. do controle negativo}}{\text{Média da D.O. do controle positivo} - \text{média da D.O. do controle negativo}}$$

\*A/P = amostra/positivo  
 \*\*D.O. = densidade ótica

Os resultados do teste de ELISA com a rVP3 foram avaliados através da análise estatística da curva ROC (*receiver operating characteristic*) que foi utilizada para verificar o desempenho do teste diagnóstico na separação das amostras quanto à presença de anticorpos anti-VP3. A referência utilizada na construção da curva ROC foi baseada na classificação prévia dos soros positivos e negativos testados com o kit comercial e dos soros negativos *naïve*. A análise estatística estabelece diferentes pontos de *cut-off* (pontos de corte), dentro da amplitude dos valores do teste, associados a diferentes sensibilidades e especificidades. Graficamente, a sensibilidade é plotada na curva ROC no eixo y, referida como verdadeiros-positivos e a especificidade é plotada no eixo x, na forma 100-sensibilidade, e referida como falsos-positivos.

A área sob a curva ROC (AUC) é uma medida de desempenho do método que avalia se a capacidade do teste de identificar os soros positivos e negativos não é devido ao acaso. Um teste incapaz de discriminar positivos e negativos teria área sob a curva 0,5, isto é, os resultados foram obtidos devido ao acaso. Quanto maior a capacidade de discriminar, mais a curva ROC se aproxima do canto superior esquerdo e a área sob a curva é igual a 1.

A análise da curva ROC incluiu todos os 107 soros do painel (TABELA 8 e soros *naïve*) e definiu o cut-off  $>0,7747$ , sensibilidade 93,75% e especificidade 85,19% (FIGURA 38- B). A AUC foi igual a 0,951. O diagrama A da figura 38 mostra que os sinais das amostras fracas positivas no teste comercial foram classificadas como negativas no teste com a rVP3. De 80 soros positivos para o teste comercial, 75 amostras foram positivas para teste com a rVP3, enquanto 5 soros não foram detectados. Dos 27 soros negativos *naïve* e no teste comercial, 23 foram negativos e 4 foram reconhecidos no teste com a rVP3 (TABELA 9).

FIGURA 38. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 PARA A IBD DE 107 SOROS DO PAINEL SOROLÓGICO. OS RESULTADOS OBTIDOS NA FORMA DE D.O. FORAM EXPRESSOS COMO ÍNDICE A/P. A. DIAGRAMA INDICANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS NA REFERÊNCIA E O *CUT-OFF* QUE DEFINE AS AMOSTRAS DO TESTE DE ELISA RVP3. B. ANÁLISE DA CURVA ROC QUE ESTABELECEU O *CUT-OFF* DE 0,7747 E SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE 93,75% E 85,19%, RESPECTIVAMENTE.

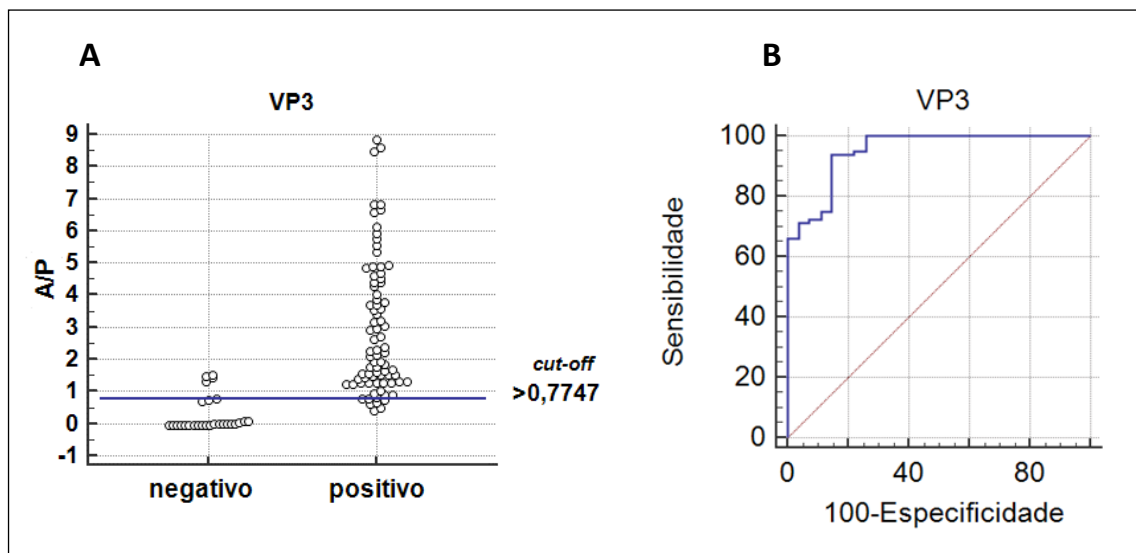


TABELA 9. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE 107 SOROS DO PAINEL SOROLÓGICO OBTIDOS NA ANÁLISE DA CURVA ROC.

Grupo: 107 soros	Ref (+)	Ref (-)	Total
rVP3 (+)	75	4	79
rVP3 (-)	5	23	28
Total	80	27	107

Ref. Resultados do teste de ELISA comercial e soros negativos de animais *naive*; rVP3: teste de ELISA com a proteína VP3 recombinante.

Outra análise da curva ROC foi realizada com o grupo de soros positivos de animais vacinados, de animais de 1 dia de idade com anticorpos maternos e de animais *naive*. A curva ROC obtida desse grupo está representada na figura 39-B. O *cut-off* obtido de  $>0,049$  representou 100% de sensibilidade e especificidade para o teste. A AUC foi igual a 1, o que indica que o teste separa perfeitamente as amostras positivas das negativas. Para este grupo de animais o teste apresentou um desempenho melhor do que para o grupo anterior. O diagrama da figura 39-A confirma os resultados. Do total de 98 amostras analisadas, 79 amostras foram positivas para os testes de ELISA com a rVP3 e comercial e 19 soros foram negativos para ambos os testes.

O teste de ELISA rVP3 quando aplicado em animais vacinados e com anticorpos maternos não apresentou falsos-positivos e falsos-negativos (TABELA 10).

FIGURA 39. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE DE ELISA COM A rVP3 PARA A IBD DE AMOSTRAS DE SOROS NEGATIVOS E POSITIVOS DE ANIMAIS VACINADOS E ANIMAIS COM ANTICORPOS MATERNNOS.

OS RESULTADOS OBTIDOS NA FORMA DE D.O. FORAM EXPRESSOS COMO ÍNDICE A/P. **A.** DIAGRAMA INDICANDO AS AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS NA REFERÊNCIA E O *CUT-OFF* QUE DEFINE AS AMOSTRAS DO TESTE DE ELISA rVP3. **B.** ANÁLISE DA CURVA ROC QUE ESTABELECEU O *CUT-OFF* DE 0,0496 E SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE 100%.

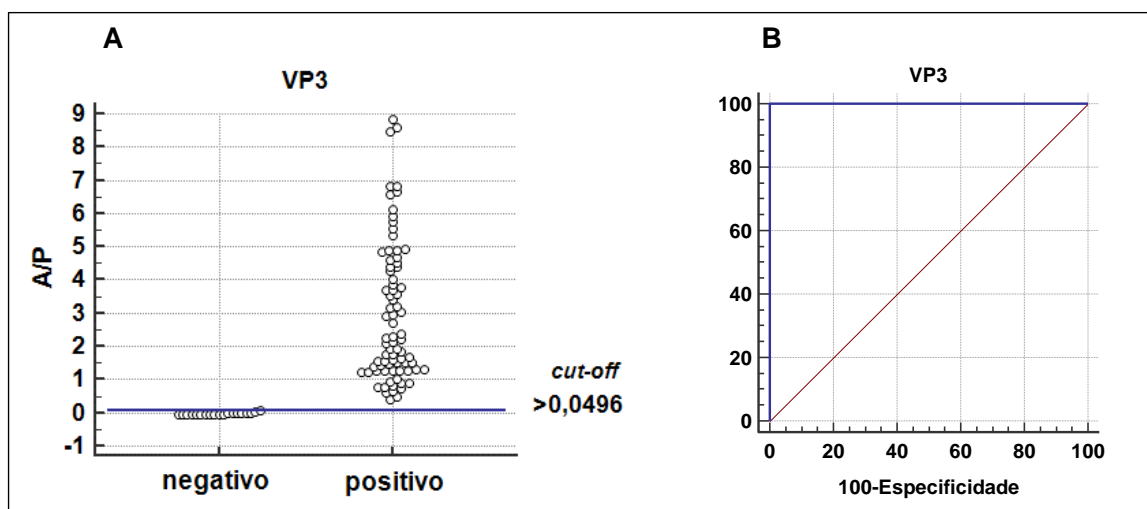


TABELA 10. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE SOROS DE ANIMAIS VACINADOS, DE ANIMAIS COM ANTICORPOS MATERNNOS E DE ANIMAIS *NAIVE* OBTIDOS NA ANÁLISE DA CURVA ROC.

Grupo: animais vacinados, animais com anticorpos maternos e animais <i>naive</i>	Ref (+)	Ref (-)	Total
rVP3 (+)	79	0	79
rVP3 (-)	0	19	19
Total	79	19	98

Ref. Resultados do teste de ELISA comercial e soros negativos de animais *naive*; rVP3: teste de ELISA com a proteína VP3 recombinante.

Um resumo das análises ROC realizadas estão apresentadas na tabela 11.

TABELA 11. RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS ROC PARA OS DOIS GRUPOS ANALISADOS: ANIMAIS VACINADOS, COM ANTICORPOS MATERNOs, NÃO VACINADOS E NAIVE.

	Grupo: animais vacinados, com anticorpos maternos e <i>naive</i>	Grupo animais vacinados e com anticorpos maternos, animais não vacinados e <i>naive</i>
AUC	1,000	0,951
<i>Cut-off</i>	0,0496	0,7747
Sensibilidade	100,00%	93,75%
Especificidade	100,00%	85,19%

O desempenho das amostras de soros de animais não vacinados (7) e as amostras de animais com *status* vacinal desconhecido (2) foram classificadas de acordo com a análise ROC realizada para animais vacinados que estabeleceu o *cut-off* 0,0496. O propósito foi avaliar o desempenho do teste com amostras contendo anticorpos não vacinais. 8 amostras foram negativas e uma positiva no teste comercial. No teste com a rVP3 todas foram positivas (TABELA 12).

TABELA 12. AMOSTRAS COM ANTICORPOS NÃO VACINAIS TESTADAS COM ELISA rVP3.

Amostra	ELISA comercial	Status	ELISA rVP3	Status
S1	0,08	-	0,32	+
S2	0,07	-	0,55	+
S3	0,08	-	0,52	+
S4	0,07	-	0,29	+
S5	0,07	-	0,30	+
S6	0,07	-	0,48	+
S7	0,08	-	0,54	+
NC*	0,50	+	0,90	+
NG*	0,07	-	0,09	+

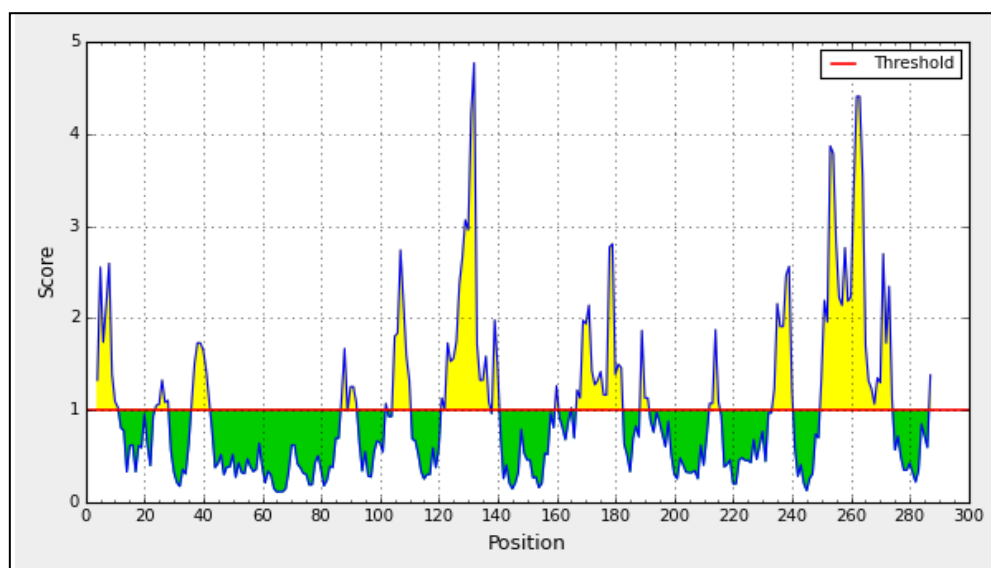
\* *status* vacinal desconhecido

### 5.11 MAPEAMENTO DAS REGIÕES ANTIGÊNICAS

Para mapear os epitopos da VP3 foram selecionadas as prováveis regiões antigênicas da proteína a partir da predição de epitopos lineares e da literatura. A predição de epitopos são análises realizadas *in silico* que permitem a localização de epitopos com base em parâmetros como hidrofobicidade, flexibilidade, acessibilidade,

polaridade e antigenicidade das cadeias polipeptídicas. Foram utilizadas as ferramentas *B Cell Epitope Prediction Tools – Prediction of linear epitopes from protein sequence* (FIGURAS 40 e 41; TABELA 13) IEDB - IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE (2016). As regiões antigênicas citadas na literatura estão localizadas entre os aminoácidos 137 ao 290 (JAGADISH; AZAD, 1991; YAMAGUSHI et al., 1996; DENG et al., 2007) (TABELA 14). Baseado neste estudo, a sequência nucleotídica da VP3 inteira foi fragmentada para obter três fragmentos maiores, sem GFP, com 130 aminoácidos cada e 7 fragmentos fusionados à GFP contendo 50 aminoácidos cada. A etiqueta de GFP foi fusionada às sequências nucleotídicas de cada fragmento para aumentar a massa molecular, além de dar estabilidade ao peptídeo contra a ação de proteases. O teste de ELISA foi primeiramente conduzido com os fragmentos sem GFP. Após a análise dos resultados verificamos que o teste dos fragmentos com GFP poderia indicar a localização mais precisa dos epítopos.

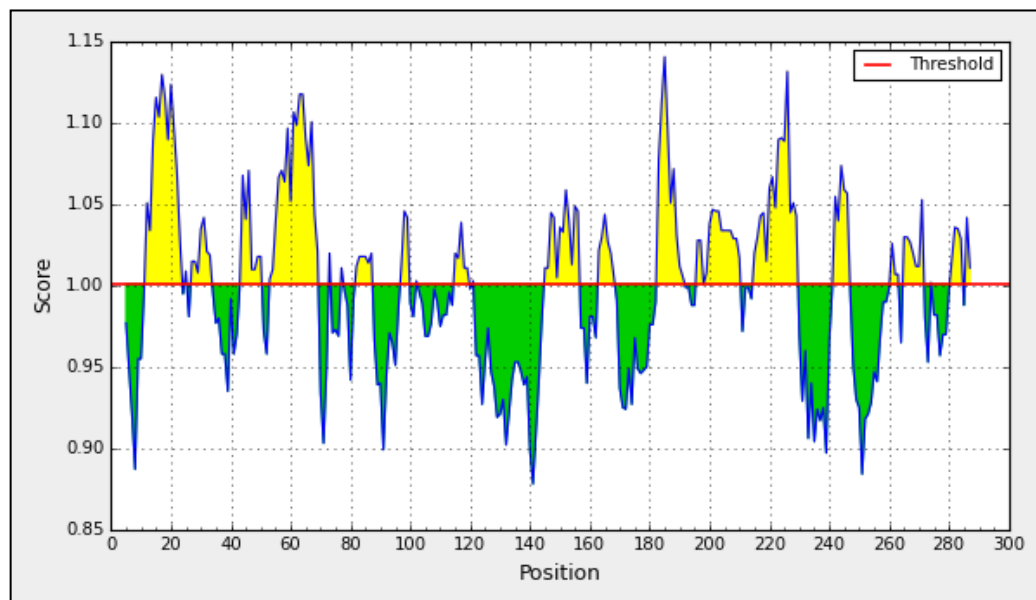
FIGURA 40. PREDIÇÃO DO PERFIL DE ACESSIBILIDADE DA SUPERFÍCIE DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA VP3, SEGUNDO EMINI ET AL., 1985. O EIXO X INDICA A POSIÇÃO DO AMINOÁCIDO E O EIXO Y O SCORE DA PROBABILIDADE DOS AMINOÁCIDOS ESTAREM EXPOSTOS NA SUPERFÍCIE DA PROTEÍNA. VALORES ACIMA DO LIMAR (*THRESHOLD*) INDICAM A ANTIGENICIDADE (JANELA=6).



FONTE: IEDB - IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE (2016).

FIGURA 41. PREDIÇÃO DE ANTIGENICIDADE DA PROTEÍNA VP3, SEGUNDO KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990.

O EIXO X INDICA A POSIÇÃO DO AMINOÁCIDO E O EIXO Y O SCORE DA PROBABILIDADE DO AMINOÁCIDO SER ANTIGÊNICO, DE ACORDO COM SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS. VALORES ACIMA DO LIMAR (*THRESHOLD*) INDICAM A ANTIGENICIDADE (JANELA=7).



FONTE: IEDB - IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE (2016).

Os fragmentos da rVP3 para mapear as regiões antigênicas foram testados por teste de ELISA contra o painel sorológico utilizado no teste com a rVP3. Foram analisados 28 soros de animais imunizados, vacinados ou com anticorpos maternos, um soro de animal não vacinado e um soro de animal com *status* vacinal desconhecido testados previamente com a rVP3. O *cut-off* foi calculado como a média da D.O. do controle negativo mais 3 desvios padrões. Os resultados foram considerados positivos quando a média da D.O. das réplicas ficou acima do *cut-off*.

Nos fragmentos sem a GFP, a sequência de resíduos de aminoácidos do fragmento anterior corresponde aos aminoácidos 1 ao 160, o médio representa os aminoácidos 80 ao 210 e o posterior corresponde aos aminoácidos 160 a 290 da proteína rVP3 inteira. Os 50 aminoácidos N-terminais dos fragmentos médio e posterior foram sobrepostos aos C-terminais dos fragmentos precedentes (FIGURA 13).



TABELA 13. PREDIÇÃO DOS EPITOPOS DA PROTEÍNA VP3 SEGUNDO OS MÉTODOS DE EMINI E KOLASHAR;TONGAONKAR.  
 POSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DOS EPITOPOS NA PROTEÍNA VP3. FRAGMENTOS DA VP3 QUE CONTÊM OS EPITOPOS PREDITOS.

Fonte	Epitopos preditos	Posição: início-fim	Fragmentos da VP3
Emini	FPHNPRDWDRLPY	2-14	F1/FA
	PSAGRQYDLA	22-31	F1/FA
	ASEFKETPELES	34-45	F1/FA
	SDPNAHR	85-91	F3/FA/FM
	NAHRMRNF	88-95	F3/FA/FM
	PQAGSK	100-105	F3/FA/FM
	GSKSQRAKYGT	103-113	F3/FA/FM
	EARGPTPEEAQREKDTRISKMETM	119-143	F3/F4/FM
	HRGPSP	158-163	F4/FM
	PGQLKY	163-168	F4/FM/FP
	QLKYWQNTREIPDPNEDYLDY	165-185	F5/FM/FP
	HAEKSRLA	187-194	F5/FM/FP
	PGQAEPPQA	210-218	F5/FP
	GRGPNQE QMKDL	232-243	F6/FP
	MEMKHRNPRRAPPKPKPKPNVPTQRPPGRL	248-277	F7/FP
	SDEDLE	285-290	F7/FP
Kolaskar & Tongaonkar	WDRLPYLNLPLYLPPSAGR	9-26	F1/FA
	PSAGRQY	22-28	F1/FA
	AGRQYDLAMAASE	24-36	F1/FA
	TPELES AVRMEAA	40-53	F1/FA
	MEAAANVDPLFQSALSVFMWLEE	50-72	F2/FA
	LEENGIV	70-76	F2/FA
	GIVTDMA	74-80	F2/FA
	MANFALSDPNAH	79-90	F2/FA
	NFLANAPQA	94-102	F3/FA/FM
	APQAGSK	99-105	F3/FA/FM
	GTAGYGV EARG	112-122	F3/FA/FM
	VEARGPT	118-124	F3/FA/FM
	TMGIYFATPEWVALNGHR	142-159	F4/FM
	GPSPGQLKYWQN	160-171	F5/FM/FP
	EDYLDYVHAEKSRLA	180-194	F5/FM/FP
	LASEEQILRAATSIYGAPGQA	193-213	F5/FP
	QAEPPQAFIDEVAKVYEINHG	212-232	F6/FP
	QMKDLLLTAME	239-249	F6/FP
	APPKPKPKPNVPTQRPP	258-274	F7/FP
	RPPGRLG	272-278	F7/FP
	GRWIRAVSDEDLE	278-290	F7/FP

TABELA 14. REGIÕES ANTIGÊNICAS DA PROTEÍNA VP3 CITADAS NA LITERATURA. POSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NA PROTEÍNA VP3. FRAGMENTOS DA VP3 QUE CONTÊM AS REGIÕES ANTIGÊNICAS.

Fonte	Epitopos preditos	Posição: início-fim	Fragmentos da VP3
Jagadish; Azad, 1991	SKKMETMGIYFATPEWVALNGHRGSPGQLKYWQNTREIPD PNEDYLDYVHAEKSRLASEEQIL	137-200	FM/FP
Mahardika; Betch, 1995	ESAVRAMEAAANVDPLFQSALSVMWLEENGIVTDMANFALSD PNAHRMRNFLANAPQAGSKSQRAKYGTAGYGVPEAR	44-121	FA/F1/F2/F3
Mahardika; Betch, 1995	GPTPEEAQREKDTRISKKMETMGIYFATPEWVALNGHRGP	121-161	FM/F4
Mahardika; Betch, 1995	YWQNTREIPDPNEDYLDYVHA	168-188	FM/FP/F5
Mahardika; Betch, 1995	EVAKVYEINHGRGPNQEQQMKDLLLTAMEMKHRNPRRALPK PKPKPNAPTQRPPGRLGRWIRTVSDLE	222-290	FP/F6/F7
Yamagushi et al., 1996	VHAEKSRLASEEQILRAATSIYGAPGQAEPPQAFIDEVAKVYEI NHGRGPNQEQQMKDLLLTAMEMKHRNPRRAPPKPKPKPNAPT QRPPGRLGRWIRAVSDELE	186-290	FP
Deng et al., 2007	MGIYFATPEW	143-152	F4/FM
Deng et al., 2007	GQAEPPQAFIDEV	211-223	F6/FP

Os fragmentos maiores sem a GFP foram testados com o mesmo protocolo do teste de ELISA rVP3. As placas foram sensibilizadas com 50 ng do antígeno (0,5 µg/mL), os soros foram testados em duplicata na diluição 1:500 e o anticorpo secundário foi diluído 1:40000. Como controle negativo foi utilizado um soro *naive*. No teste de ELISA os três fragmentos sem GFP foram reconhecidos por todos os soros analisados. A resposta da reatividade dos soros medida em D.O. foi variável nos três fragmentos. No fragmento anterior a D.O. mínima foi 0,09 e a máxima 1,47. No fragmento médio a resposta variou de 0,08 a 0,45 e no posterior de 0,11 a 1,67 (TABELA 15).

As médias das D.O. calculadas para os fragmentos anterior, médio e posterior foram 0,49, 0,21 e 0,53, respectivamente (FIGURA 42).

FIGURA 42. GRÁFICO DAS MÉDIAS DAS D.O. OBTIDAS NO TESTE DE ELISA COM OS FRAGMENTOS NÃO FUSIONADOS À GFP E COM A rVP3.

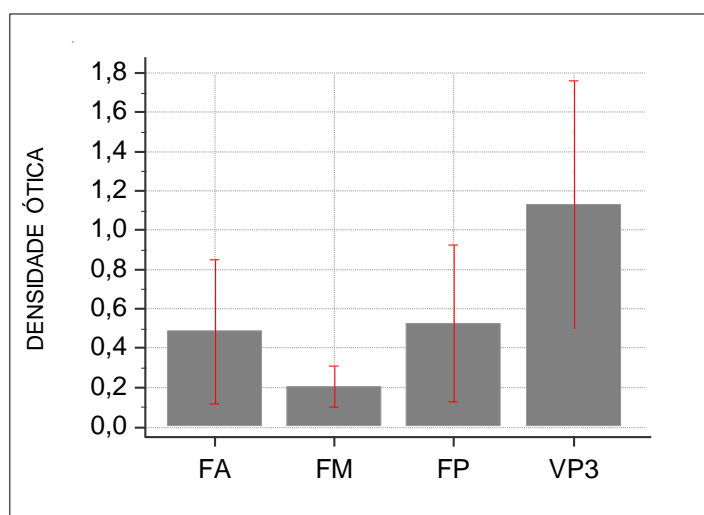


TABELA 15. RESULTADOS DA D.O. DO TESTE DE ELISA COM OS FRAGMENTOS NÃO FUSIONADOS À GFP.

<b>Soros</b>	<b>FA</b>	<b>FM</b>	<b>FP</b>	<b>VP3</b>
ME33	0,128	0,128	0,177	0,343
ME39	1,473	0,359	1,672	2,429
ME88	0,720	0,292	0,816	1,800
ME178	0,440	0,344	0,590	1,160
ME208	0,280	0,180	0,204	0,702
ME211	0,403	0,174	0,319	0,992
ME214	0,552	0,193	0,375	1,179
ME219	0,710	0,184	0,535	1,727
ME223	0,139	0,165	0,147	0,258
ME227	0,598	0,232	1,003	1,851
ME228	0,674	0,110	0,481	1,074
ME262	1,168	0,337	1,253	2,123
ME267	0,798	0,205	0,482	1,341
ME275	0,849	0,451	1,081	2,322
G1	0,140	0,076	0,242	0,622
G12	0,110	0,107	0,178	0,593
G17	0,164	0,152	0,195	0,536
G18	0,701	0,189	0,414	1,206
G20	0,410	0,202	0,362	1,035
G22	0,658	0,196	0,644	1,461
G23	0,424	0,187	0,557	1,221
G25	0,152	0,090	0,285	1,004
G27	0,095	0,098	0,110	0,226
G28	1,300	0,449	1,030	1,955
G33	0,513	0,172	0,379	0,980
G34	0,248	0,080	0,593	1,155
G43	0,093	0,094	0,118	0,370
G47	0,588	0,387	1,293	1,795
NC	0,187	0,237	0,410	0,935
S9	0,212	0,203	0,223	0,402
<i>Cut-off</i>	0,061	0,053	0,056	*
Média	0,497	0,209	0,539	1,160
Desvio padrão	0,366	0,106	0,400	0,621
Mediana	0,432	0,189	0,412	1,115
D.O.mínima	0,093	0,076	0,110	0,226
D.O.máxima	1,473	0,451	1,672	2,429

FA: fragmento anterior

FM: fragmento médio

FP: fragmento posterior

Soros ME: animais vacinados

Soros G: animais imunizados com anticorpos maternos

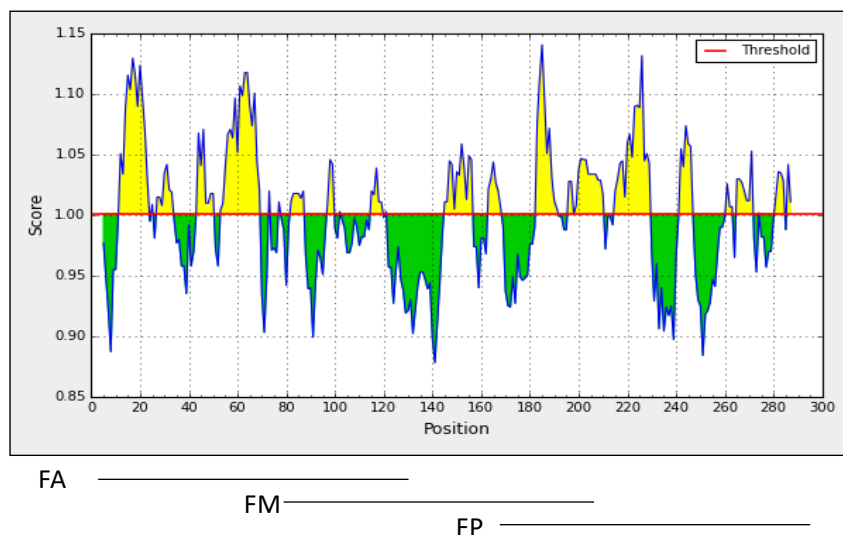
Soro S9: animal não vacinado

Soro NC: status vacinal desconhecido

\* não calculado

De acordo com os resultados experimentais, a predição *in silico* de Kolaskar; Tongaonkar (1990) baseada nas características físico-químicas das proteínas, definiu os terços anterior e posterior da VP3 como as regiões mais antigênicas (FIGURA 43).

FIGURA 43. ANTIGENICIDADE DA PROTEÍNA VP3 (PREDIÇÃO SEGUNDO KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990) E FRAGMENTOS. AS REGIÕES MAIS ANTIGÊNICAS (PICOS AMARELOS) CORRESPONDEM AOS FRAGMENTOS FA E FP DA VP3.



Nos fragmentos fusionados à GFP, os 10 aminoácidos N-terminais de cada fragmento foram sobrepostos aos C-terminais dos fragmentos anteriores, exceto o primeiro fragmento (FIGURA 13).

A sequência e a posição dos fragmentos com GFP na proteína inteira, bem como a quantidade de soros reativos frente à cada fragmento estão apresentados na tabela 16.

O teste de ELISA dos fragmentos F1 ao F7 foi primeiramente padronizado com o F5 e testado nas seguintes condições: 50, 100, 200, 300 e 400 ng de proteína (0,5, 1, 2, 3 e 4 µg/mL), soros positivos e negativos diluídos 1:500 e conjugado diluído 1:20000 e 1:40000. A reatividade dos soros foi mais alta com: 100 ng (1 µg/mL) de proteína e conjugado diluído 1:20000. Os soros utilizados foram os mesmos soros testados com os fragmentos não fusionados à GFP. As placas foram sensibilizadas com 100 ng do antígeno (1 µg/mL), os soros foram testados em duplicata na diluição 1:500 e o anticorpo secundário foi diluído 1:20000. A concentração de GFP utilizada para sensibilizar a placa foi equivalente à massa molecular do fragmento. Os resultados da D.O. dos fragmentos foram normalizados com a GFP subtraindo a média da

D.O. dos fragmentos da média da D.O. da GFP. Não houve reação dos soros analisados contra o fragmento 3. A presença de reatividade e a resposta dos anticorpos, medida em D.O., frente a cada fragmento foi variada. Entre os 30 soros analisados, 7 reagiram contra o fragmento 1, 29 reagiram contra os fragmentos 2 e 7, 7 contra o fragmento 4, 16 contra o fragmento 5 e 14 contra o fragmento 6. Mais soros reagiram mais com os F2 e F7, exceto um soro de animal vacinado (TABELA 16). Em média, a reação contra os fragmentos 1, 2 e 4 foram menores do que contra os fragmentos 5, 6, e 7. A D.O. média dos fragmentos 1, 2 e 4 foi 0,11, 0,15 e 0,16, respectivamente. A D.O. média dos fragmentos 5, 6 e 7 foi 0,43, 0,38 e 0,51, respectivamente (TABELA 17).

TABELA 16. FRAGMENTOS 1 AO 7 DA VP3 POSIÇÃO DOS AMINOÁCIDOS NA PROTEÍNA INTEIRA E NÚMERO DE SOROS REATIVOS EM CADA FRAGMENTO.

FRAGMENTO	SEQUÊNCIA DE AA	POSIÇÃO DO AA	Nº DE SOROS REATIVOS
F1	MFPHNPRDWDRLPYLNLPLYLPPSAG RQYDLAMAASEFKETPELES AVRAM	1-50	7/30
F2	PELES AVRAM EAAANVDPLFQSALSV FMWLEENGIVTDMANFALSDPNAH	41-90	29/30
F3	NFALSDPNAHRMRNFLANAPQAGSK SQRAKYGTAGYGVEARGPTPEEAQR	81-130	0/30
F4	RGPTPEEAQREKDTRISKMETMGIYF ATPEWVALNGHRGPSPGQLKYWQ	121-170	7/30
F5	PSPGQLKYWQNTREIPDPNEDYLDYV HAEKSRLASEEQILRAATSIYGAP	161-250	16/30
F6	RAATSIYGAPGQAEPQAFIDEVAKVY EINHGRGPNQE QMKDLLLLTAMEM	201-250	14/30
F7	KDLLLLTAMEMKHRNPRRAPPKPKPKP NVPTQRPPGRLGRWIRAVSDEDLE	241-290	29/30

TABELA 17. RESULTADOS DA D.O. DO TESTE DE ELISA COM OS FRAGMENTOS 1 AO 7 FUSIONADOS À GFP.

Soros	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
ME33	-	0,114	-	-	-	-	0,120
ME39	0,087	0,155	-	0,163	0,664	2,706	1,569
ME88	0,210	0,399	-	0,144	0,590	0,341	1,304
ME178	0,091	0,248	-	-	0,803	0,104	0,859
ME208	-	0,181	-	-	-	-	0,284
ME211	0,099	0,190	-	0,100	-	0,133	0,171
ME214	0,125	0,229	-	-	-	0,152	0,190
ME219	-	-	-	-	0,118	0,249	-
ME223	-	0,086	-	-	-	-	0,057
ME227	-	0,173	-	-	0,215	0,215	0,111
ME228	-	0,060	-	-	-	-	0,069
ME262	0,061	0,186	-	0,501	0,913	0,647	0,255
ME267	0,099	0,241	-	-	0,364	0,329	0,324
ME275	-	0,057	-	0,066	1,114	0,071	0,067
G1	-	0,171	-	-	-	-	1,148
G12	-	0,142	-	-	-	-	0,212
G17	-	0,134	-	-	-	-	0,136
G18	-	0,163	-	0,06	0,136	0,089	0,328
G20	-	0,228	-	-	0,128	-	0,201
G22	-	0,186	-	-	0,195	0,160	0,312
G23	-	0,127	-	-	0,384	0,065	0,208
G25	-	0,092	-	-	-	-	0,316
G27	-	0,156	-	-	-	-	0,088
G28	-	0,171	-	-	0,417	-	0,220
G33	-	0,062	-	-	0,094	0,063	0,120
G34	-	0,089	-	-	-	-	1,910
G43	-	0,165	-	-	-	-	0,154
G47	-	0,063	-	-	0,544	-	3,927
NC	-	0,077	-	-	0,287	-	0,101
S9	-	0,126	-	0,073	-	-	0,127
Cut-off	0,058	0,057	0,048	0,052	0,049	0,057	0,054
Média	0,110	0,154	*	0,158	0,435	0,380	0,513
Desvio padrão	0,048	0,073	*	0,156	0,311	0,688	0,814
Mediana	0,099	0,156	*	0,100	0,374	0,156	0,208
D.O. mínima	0,061	0,057	*	0,060	0,094	0,063	0,057
D.O. máxima	0,210	0,399	*	0,501	1,114	2,706	3,927

F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7: fragmentos 1 a 7 da rVP3

Soros ME: animais vacinados

Soros G: animais imunizados com anticorpos maternos

Soro S9: animal não vacinado

Soro NC: status vacinal desconhecido

\* não calculado

- D.O. abaixo do *cut-off*

## 6 DISCUSSÃO

A produção de diagnóstico animal é uma das atuações do Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar, instituição na qual a doutoranda atua profissionalmente. Este trabalho tem como propósito utilizar a tecnologia absorvida para melhorar o desempenho e produtividade da instituição na linha de diagnósticos animais, além de gerar um produto para ser aproveitado pela empresa. Também, a tecnologia pode ser aplicada a diversos segmentos dentro da empresa, levando ao desenvolvimento de outros modelos de proteínas recombinantes para produção de diversos outros produtos.

O tema do doutorado, diagnóstico de aves, foi escolhido após contatos com instituições públicas e privadas quando se verificou a premente necessidade da produção de reagentes diagnósticos produzidos nacionalmente para diminuir os custos e evitar trâmites burocráticos de importação. Com essas instituições tivemos a oportunidade de discutir as lacunas onde poderíamos estar atuando.

A doença infecciosa da bursa é uma doença de aves relevante para o comércio internacional de animais e de seus produtos (OIE, 2016). Está associada à mortalidade e imunossupressão dos animais. Considerando a importância econômica da avicultura para o Brasil e o estado do Paraná, é obrigatório a tomada de medidas de controle em granjas comerciais, que visem a prevenção de surtos e a vigilância sobre o aparecimento de novas variantes, mais patogênicas, e que não respondem às vacinas.

Testes diagnósticos constituem ferramentas importantes para o controle da doença. São utilizados para qualificar a condição de saúde do animal em relação à doença, para certificar a sanidade animal no comércio internacional, para verificar a prevalência da doença e avaliar os riscos e para determinar o status imune dos animais. Entre os testes diagnósticos para a IBD, as técnicas de isolamento e identificação do vírus são métodos confirmatórios, mas não indicados como testes de rotina, devido à dificuldade de isolar o agente. Os testes sorológicos realizados em amostras de sangue que podem ser coletadas ao longo do curso da doença, ou mais tarde, são mais indicados para rotina. Dentre esses, o teste de ELISA é um método seguro, rápido e específico, bastante difundido, inclusive apresenta-se disponível comercialmente.

A utilidade do teste de ELISA na detecção de doenças veterinárias e na avaliação da eficiência do programa de vacinação em granjas comerciais é demonstrada em vários estudos (TODD et al., 1999; WANG et al., 2008; PARKER; DE WIT, 2014). Atualmente, insumos diagnósticos aplicados na indústria são importados, contribuindo para o aumento dos custos da cadeia produtiva. Convencionalmente, o antígeno utilizado no teste de ELISA consiste do macerado viral propagado em culturas celulares. A produção apresenta limitações como o manuseio do vírus, que deve ser realizado em condições seguras de contenção e a dificuldade de adaptação de cepas muito patogênicas na cultura celular. Como alternativa, o desenvolvimento de antígenos recombinantes é viável do ponto de vista econômico, tecnológico e de biossegurança.

Neste trabalho foi desenvolvida uma proteína recombinante para ser utilizada em teste diagnóstico da IBD, como alternativa ao teste convencional, e com a intenção de nacionalizar a produção de insumos e diminuir a dependência tecnológica no setor. A proteína recombinante foi avaliada quanto à sua sensibilidade e especificidade no teste de ELISA. Porém, o produto desenvolvido pode ser empregado em diferentes plataformas de diagnósticos, das mais simples às mais complexas. O antígeno pode ser aplicado em testes rápidos como os de fluxo-lateral que são simples, baratos, não necessitam de treinamentos especializados e de estrutura laboratorial, oferecem resultados rápidos e podem ser realizados no campo. Pode ser utilizado em testes de micro-arranjos líquidos que utilizam tecnologia mais avançada e mão de obra qualificada, mas que são capazes de detectar vários agravos simultaneamente.

A seleção das proteínas antigênicas do IBDV, VP2 e VP3, foi o ponto de partida para o desenvolvimento dos antígenos recombinantes. Como não foi possível obter a VP2 nos sistemas avaliados, os esforços foram concentrados na produção da VP3. Os resultados do alinhamento indicaram a variabilidade da VP2, e nove sequências foram sintetizadas para representar o polimorfismo. O intuito era selecionar, entre essas sequências, as mais antigênicas no diagnóstico e utilizá-las em um teste que contemplasse a variabilidade das cepas vacinais e selvagens do vírus. Além da região antigênica encontrada na porção central da VP2, a literatura descreve epitopos lineares nas regiões C e N-terminais (AZAD et al., 1987a; CUI ET AL., 2003; PRADHAN ET AL., 2012). O propósito era fragmentar a VP2 inteira e obter fragmentos das regiões N e C-terminais. A seguir, mapear as regiões antigênicas e avaliar sua utilização em teste diagnóstico. Ao contrário, a VP3 é conservada, como foi conferido no alinha-



mento realizado com 145 sequências da poliproteína. A VP3 apresenta epitopos específicos para o sorotipo I, que é patogênico para as galinhas, além dos epitopos reconhecidos pelos dois sorotipos (OPPLING ET AL., 1991). Os epitopos conservados sorotipo I-específicos da VP3, comuns a todas as cepas (vacinais e selvagens) podem ser potencialmente utilizados nos testes diagnósticos para englobar a variabilidade do vírus. O mapeamento das regiões antigênicas realizado neste trabalho propôs-se a identificar estes epitopos.

## 6.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As sequências das proteínas VP2 e VP3 selecionadas foram disponibilizadas em bancos de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências nucleotídicas foram obtidas através da síntese gênica comercial. A diferença do *codon usage* entre o vírus e o organismo escolhido para expressão foi considerada. A presença de códons raros, não utilizados pelo organismo hospedeiro, poderia acarretar a interrupção da tradução ou a produção de proteínas truncadas, devido à pouca abundância do RNAt. A otimização da sequência gênica foi realizada para expressão no organismo escolhido, sem alterar a sequência de aminoácidos e permitir o correto processo de tradução (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

As estratégias de expressão avaliadas visaram a solubilidade e rendimento das proteínas levando em consideração as características estruturais nativas de cada peptídeo e a categoria dos epitopos quanto à sua disposição, linear ou conformacional. A VP2 é a proteína externa do capsídeo que induz a produção de anticorpos neutralizantes (BECHT ; MULLER, 1988) os quais reagem com epitopos conformacionais localizados na região central da VP2 ( AZAD et al., 1987a; BAYLISS et al., 1990; HEINE et al., 1991; WANG et al., 2005). Neste estudo experimentos foram conduzidos para expressar a VP2 em células de insetos com o vetor pMIBV5/HisA. Contudo, a proteína não foi expressa. Considerando que células transfectadas foram selecionadas com blasticidina indicando a presença do plasmídeo, a proteína pode ter sido degradada, uma vez que, inibidores de proteases não foram adicionados ao meio. Mais experimentos para otimizar este protocolo poderiam ser realizados mas como o sistema foi testado em outros projetos no laboratório sem sucesso, e para não atrasar

o cronograma, decidiu-se abandonar esta estratégia e dar prosseguimento à expressão em bactérias. Células de insetos em sistema de baculovírus foram utilizadas para expressar as proteínas VP2 e VPX (pVP2 não processada) e a poliproteína (VP2+VP3+VP4), que se organizaram espontaneamente em conformações tubulares ou icosaédricas similares aos capsídeos, e apresentaram potencial para a produção de vacinas recombinantes (MARTINEZ-TORRECUADRADA et al., 2000b; WANG et al., 2000; LEE et al., 2004; XU et al., 2011; GE et al., 2015).

No sistema procarioto, fatores como a cepa hospedeira, temperatura, tempo de indução e concentração de IPTG influenciam a solubilidade e rendimento da proteína (DONOVAN et al., 1996; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005; PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2016). Um protocolo de expressão, variando as condições, foi padronizado para expressão de cada proteína. A estabilidade das proteínas foi testada com diferentes cepas de *E. coli* derivadas da BL21, deficientes nas proteases *lon* e *OmpT*. A cepa BL21 Star apresenta uma mutação no gene que codifica a *rnase E* que reduz a degradação do RNA mensageiro, aumentando a estabilidade da proteína (Invitrogen, 2016). A cepa Turner pLysS, através da mutação no gene da lac permease permite a regulação da entrada de IPTG na célula hospedeira diminuindo o nível da expressão da proteína recombinante e, com isso, promovendo a solubilidade. O plasmídeo pLysS produz a lisozima T7, um inibidor natural da T7 polimerase, para reduzir a expressão basal da proteína, antes da adição do indutor, evitando a morte da célula hospedeira ou a perda do vetor de expressão, no caso da proteína ser tóxica para a bactéria. A cepa Rosetta-gami apresenta mutações nos genes *trxB* e *gor* que estimulam a formação de pontes dissulfeto no citoplasma (NOVAGEN, 2016). A expressão da chaperona DsbC na cepa Shuffle pode auxiliar no enovelamento da proteína (NEB, 2016).

A temperatura e tempo de indução influenciam na solubilidade e rendimento da proteína recombinante. Em geral, a solubilidade aumenta quanto menor for a temperatura de crescimento, a síntese da proteína é reduzida e mais tempo de indução é necessário para acumular a proteína (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2016). O aumento da concentração de IPTG não significa aumento da expressão da proteína. Em geral, a melhor concentração do indutor leva à diminuição do crescimento bacteriano e ao aumento da expressão da proteína recombinante (DONOVAN et al., 1996).

Os resultados em bactérias mostraram que a VP2 não foi expressa em quantidades suficientes para serem detectadas por SDS-PAGE. Após a transferência da

proteína para a membrana de nitrocelulose e revelação com fosfatase alcalina pode-se observar a expressão da VP2 preferencialmente nas frações insolúveis. Na faixa de concentração testada, o IPTG não teve influência na expressão da proteína. A expressão na cepa Shuffle a 20 °C, por 16 a 18 horas, com 0,5 mM de IPTG apresentou uma discreta melhora no rendimento e solubilidade. Ao testar esta condição em larga escala esperava-se um rendimento maior da proteína solúvel, contudo isso não ocorreu. É provável que a maquinaria da bactéria não tenha sido capaz de processar a região altamente hidrofóbica central da VP2. Omar et al. (2006) expressaram a VP2 solúvel em *E. coli* cepa BL21-SI a 30 °C, por 3 horas e 0,3 M de NaCl mas não a obtiveram dobrada corretamente e a proteína não foi capaz de induzir resposta imune que conferisse proteção para danos associados à bursa. A VP2 fusionada a NusA (N utilization substance A) (SEDIGHZADEH et al. 2012) e a MBP (*maltose binding protein*) (JIANG et al., 2016) foram expressas solúveis e com bom rendimento nas cepas BL21 (37 °C, 6 horas, 1 mM de IPTG) e BL21 pLysS (23 °C, 20 horas, 1 mM de IPTG), respectivamente. As quimeras adquiriram a conformação semelhante à VP2 obtida por sistema eucarioto e, pelo menos, a NusA-VP2 reagiu com anticorpo anti-VP2 em teste de ELISA. Observa-se que as etiquetas de fusão contribuíram para melhorar a solubilidade e rendimento da VP2 e que a cepa, a temperatura e tempo de indução e a concentração do indutor não tiveram impacto na solubilidade. No entanto, GST (*glutathione-S-transferase*), SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) e outras etiquetas avaliadas pelos autores não apresentaram a mesma eficiência, bem como a GFP, avaliada neste trabalho.

A sequência proteica inteira da VP3 foi expressa em corpos de inclusão em todas as condições testadas. O melhor rendimento foi obtido na cepa BL21 Star a 37 °C, por 4 horas. Na faixa de concentração testada, o IPTG não influenciou na expressão da VP3. Essa condição de temperatura e tempo de indução, com 0,5 mM de IPTG foi escolhida para expressar a proteína e dar continuidade nos testes sorológicos. A literatura científica refere-se preferencialmente à cepa BL21 (DE3) para a expressão da VP3, na temperatura de 37 °C, solúvel (DENG et al., 2007; WANG et al., 2008) e insolúvel (PITCOVSKI et al., 1999; SINGH et al., 2010). Utilizando a variação BL21 pLysS, a 37 °C, indução por 3 horas e com 1 mM de IPTG, Wang et al. (2008) obtiveram a proteína VP3 solúvel. No entanto, Singh et al. (2010) com a mesma cepa, com três horas de indução e 1 mM de IPTG (não informou a temperatura) expressou a VP3 em corpos de inclusão. Os resultados sobre a solubilidade da VP3 na BL 21

são contraditórios e a razão dessa discordância é desconhecida. Neste trabalho a VP3 foi solubilizada dos corpos de inclusão com 2 M de ureia. Segundo Vallejo; Rinas (2004), em condições não extremas de desnaturação como a utilizada neste estudo, a proteína mantém sua estrutura secundária nativa e pode apresentar atividade biológica. A ureia também foi utilizada na solubilização das proteínas por PITCOVSKI et al. (1999) e SINGH et al. (2010).

Os fragmentos maiores (FA, FM e FP) e os menores da VP3 (F1 a F7) foram expressos na fração solúvel na BL 21 Star, a 20 °C, por 16 a 18 horas, com 0,5 mM de IPTG. Verificou-se que a banda correspondente ao FA apresentou no gel de SDS-PAGE e no *western blot* um tamanho menor do que o esperado para peptídeo indicando uma degradação na região C-terminal, uma vez que a etiqueta de histina foi introduzida na região N-terminal. A região corresponde aos aminoácidos sobrepostos que foram expressos no fragmento adjacente FM. Em relação à proteína inteira, o tamanho da cadeia peptídica dos fragmentos pode ter contribuído para melhorar a solubilidade.

A fusão da GFP nos fragmentos menores da VP3 teve como propósito aumentar a massa molecular, melhorar a estabilidade e solubilidade da proteína, além de ser um indicador da expressão (WALDO et al., 1999). Os fragmentos solúveis F1 ao F7 foram migrados por SDS-PAGE e um perfil de múltiplas bandas foi verificado. Esse perfil foi relatado por Aoki et al. (1996) no estudo da proteína A fusionada à GFP. Os autores presumiram que a alta estabilidade da GFP pode influenciar na mobilidade por SDS-PAGE e, como a GFP não é completamente desnaturada pelo SDS, diferentes conformações da proteína migram em diferentes posições no gel. Esta hipótese foi testada submetendo ou não os extratos das proteínas a alta temperatura (95 °C), por 5 minutos e analisados por SDS-PAGE. Verificou-se padrões diferentes das bandas, com fervura e sem fervura, indicando diferentes níveis de desnaturação das proteínas. Não foi necessário a clivagem da sequência da GFP pela protease TEV. A GFP isoladamente apresentou baixa reatividade no teste de ELISA. Além disso, os resultados da densidade ótica dos fragmentos foram normalizados com os da GFP.

## 6.2 SOROS

Os soros do painel utilizado neste estudo são de animais imunizados vacinados ou com anticorpos maternos, de animais não vacinados de criação doméstica, de animais com *status* vacinal desconhecido e de animais naive, provenientes de várias fontes. Para obtê-los, acordos foram estabelecidos com os parceiros após diversos contatos. Os soros foram avaliados pelo teste comercial IdexxIBD Ab Test®. A utilização do teste comercial, ao invés do teste de vírus neutralização, deve-se à falta de disponibilidade para execução desse teste no laboratório em que foi conduzido o estudo. Wang et al. (2008) e Singh et al. (2010) avaliaram o mesmo teste comercial utilizando como referência o teste de vírus neutralização e verificaram 99% e 96,1% de sensibilidade, respectivamente.

## 6.3 SLOT BLOT

Os primeiros testes de ELISA para avaliar os antígenos recombinantes foram revelados com fosfatase alcalina. Os resultados não foram promissores apresentando sinais muito fracos com densidades óticas em torno de 0,1. Como não havia disponibilidade de outros reagentes naquele momento, o *slot blot* com revelação por quimioluminescência foi uma opção alternativa por ser um método de revelação sensível, de leitura visual e utilização de instrumentos simples.

A proteína VP3 inteira foi analisada por *slot blot* com revelação por quimioluminescência com 137 soros de animais vacinados e não vacinados. Dos 10 animais negativos no teste comercial, 8 foram positivos no *slot blot* que pode ser explicado pela maior sensibilidade do método. Dos 127 animais positivos no teste comercial, 2 foram negativos no *slot blot*. Os testes foram continuados com os fragmentos menores fusionados à GFP e as respostas para alguns soros não se repetiram. A presença da GFP foi considerada uma justificativa para a inconsistência dos resultados. Os resultados discrepantes mostraram que a técnica não é reprodutível, além de ser laboriosa para aplicar em testes de rotina.

Os testes de ELISA foram retomados com outro revelador, a peroxidase, e os resultados foram discutidos a seguir.

## 6.4 TESTE DE ELISA COM A rVP3

Neste trabalho, conforme discutido anteriormente, a proteína rVP3 foi induzida em *E.coli* cepa BL21 (DE3) Star apresentando altos níveis de expressão. Embora tenha sido recuperada dos corpos de inclusão, e solubilizada em baixa concentração de ureia, esta condição não afetou o reconhecimento dos epitopos pelos anticorpos, uma vez que os resultados do teste de ELISA demonstraram boa sensibilidade comparada com a referência. Ademais, os epitopos descritos na VP3 são lineares, e não há necessidade de dobramento da proteína para que os anticorpos a reconheçam (YAMAGUCHI et al., 1996; DENG et al., 2007).

Martinez-Torrecuadrada et al. (2000a) produziram VPX (pVP2 não processada) e VP3 em células de insetos. Avaliaram os antígenos em teste indireto de ELISA. Verificaram que o teste com a VPX apresentou boa correlação ( $R^2=0,84$ ) com testes comerciais que utilizam o lisado viral com antígeno. Este comportamento não se repetiu com a VP3 ( $R^2 < 0,5$ ). O teste com a VP3 em soros de animais vacinados foi menos sensível e específico que o teste da VPX. O teste com VPX teve maior capacidade de discriminar os soros negativos dos positivos. Os autores não apresentaram os valores de sensibilidade e especificidade.

Wang et al. (2008) expressaram a VP3 em BL21 (DE3) pLysS e a VP2 em células de insetos. Avaliaram os antígenos em testes indireto de ELISA e verificaram que o teste da VP3 apresentou melhor desempenho que o da VP2. Ambos foram comparados com o teste de vírus neutralização em soros de animais de fazenda e animais vacinados. A sensibilidade obtida para os testes da VP3 foi 100% e da VP2 foi 96,2%. As especificidades foram 92,8% e 86,2%, para VP3 e VP2, respectivamente.

Singh et al. (2010) compararam os resultados de soros de animais mantidos em contenção testados por vírus neutralização, com os testes de ELISA da VP3 produzidas em *E. coli* e da VP2 expressa em leveduras. Os resultados exibiram 97,4% e 94,8% de sensibilidade da VP3 e VP2, respectivamente, e 95,9% de especificidade da VP3 e VP2.

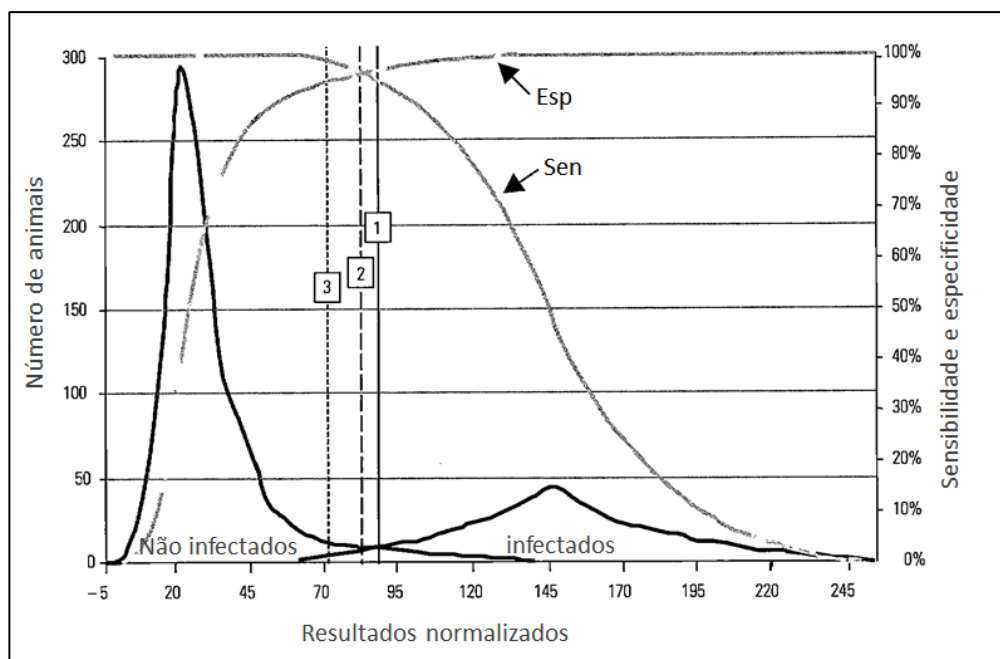
Três relatos de utilização da VP3 recombinante para diagnóstico foram encontrados na literatura. Dois desses indicaram que a VP3 produzida em *E. coli* é mais sensível e apresenta especificidade maior ou igual a da VP2, produzida em sistema eucarioto (WANG et al.; 2008; SINGH et al.; 2010). No teste em que o desempenho

da VP3 foi menor, a proteína foi produzida em células de insetos, assim como a VPX (MARTINEZ-TORRECUADRADA et al., 2000a). Nesse caso, a expressão da VP3 em célula de inseto pode não ter sido eficiente, embora o sistema seja mais adequado para manter as características de enovelamento da proteína. Por outro lado, os autores utilizaram a VPX que contém 46 aminoácidos C-terminais que, mais tarde, são clivados para obter a VP2 madura. A VPX está presente no capsídeo (ICTV, 2012) e pode ser mais reativa que a VP2 processada.

Neste estudo, o teste de ELISA com a rVP3 quando foi aplicado ao grupo de animais imunizados, vacinados ou com anticorpos maternos, e *naïve* apresentou sensibilidade (100%) comparável aos de Wang et al. (2008). No entanto, foi mais específico (100%) que o desenvolvido por esses autores. A AUC foi igual a 1, o que indica que o teste separa perfeitamente as amostras positivas das negativas. Os resultados mostram que o teste tem potencial para diagnosticar o estado imunológico pós-vacinação dos animais.

Quando aves caipiras não vacinadas foram incluídas na avaliação do desempenho do teste, esse foi reduzido. Embora a sensibilidade de 93,75% ainda seja satisfatória, os negativos não foram eficientemente diagnosticados e a especificidade diminuiu para 85,19%. Uma alternativa para melhorar o desempenho das 5 amostras positivas no teste comercial e não detectadas no teste da rVP3 é ponderar o risco de assumir falsos-negativos e escolher um *cut-off* menor, privilegiando a sensibilidade e diminuindo a especificidade do teste (FIGURA 44). Soros de quatro animais não vacinados e não confinados, diagnosticados como negativos no teste comercial, foram positivos nesta avaliação do teste com a rVP3. Uma das explicações que pode ter gerado esse resultado refere-se à maior quantidade de moléculas de rVP3 acessíveis no teste de ELISA rVP3 em relação ao teste comercial. Este último é produzido a partir do lisado viral e a carga de antígeno VP3 é menor que no teste recombinante. No teste comercial não há quantidade suficiente do antígeno VP3 para revelar a presença dos anticorpos presentes nas aves não imunizadas.

FIGURA 44. SELEÇÃO DE PONTOS DE CUT-OFF OBTIDOS POR ANÁLISE DA CURVA ROC (EIXO X) EM FUNÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE (EIXO Y). A CURVA ROC ESTÁ SOBREPOSTA SOBRE UM GRÁFICO DE FREQUÊNCIA DOS VALORES TESTADOS. TRÊS PONTOS DE *CUT-OFF* SÃO REPRESENTADOS (1, 2 E 3): *CUT-OFF* 1 ESTÁ ASSOCIADO A MENOR SENSIBILIDADE (95%) E MAIOR ESPECIFICIDADE (98%) E MINIMIZA OS FALSOS POSITIVOS; *CUT-OFF* 2 A SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE SÃO IGUAIS (97,5%); *CUT-OFF* 3 ESTÁ ASSOCIADO A MAIOR SENSIBILIDADE E MENOR ESPECIFICIDADE, MINIMIZANDO OS FALSOS NEGATIVOS.



FONTE: adaptado de JACOBSON (1998).

A maior quantidade de moléculas de rVP3 acessíveis no teste de ELISA rVP3 em relação ao teste comercial também pode explicar o desempenho das amostras de soros de animais não vacinados (7) e as amostras de animais com *status* vacinal desconhecido (2) quando foram classificadas de acordo com a análise ROC realizada para animais vacinados que estabeleceu o *cut-off* 0,0496. Todas as amostras foram reconhecidas no teste rVP3, enquanto no teste comercial apenas uma delas foi positiva.

## 6.5 MAPEAMENTO DAS REGIÕES ANTIGÊNICAS

JAGADISH; AZAD (1991), OPPLING et al. (1991), MAHARDIKA;BETCH (1995), YAMAGUCHI et al. (1996) e DENG et al. (2007) avaliaram a reatividade da VP3 ou dos peptídeos obtidos por deleção da sequência da poliproteína ou da VP3



com enzimas de restrição contra anticorpos monoclonais específicos para os dois sorotipos do vírus, por teste de ELISA ou por *imunoblot*.

Baseado na predição de epitopos *in silico* e dados da literatura obtivemos possíveis localizações de epitopos. As informações da literatura sobre as regiões antigênicas foram em sua maioria discordantes. No delineamento dos fragmentos avaliados neste estudo procurou-se englobar todas as regiões antigênicas obtidas na predição e na literatura. Os fragmentos foram clonados e expressos como descrito anteriormente. As análises foram realizadas por teste de ELISA indireto contra um painel sorológico de aves vacinadas e não vacinadas. Uma investigação mais abrangente, utilizando fragmentos com 130 aminoácidos, mostrou um padrão de reatividade para a proteína VP3: os terços N e C-terminais da proteína VP3 (FA e FM) são mais reativos (maior D.O.) que a porção mediana (FM). Um perfil de antigenicidade semelhante foi estabelecido na predição de epitopos segundo o método de Kolaskar;Tongaonkar (1990) baseado nas propriedades físico-químicas da proteína. A reatividade encontrada contra o FP foi corroborada pelos dados obtidos por Yamagushi et al. (1996) que identificaram, em fragmentos recombinantes expressos em *E. coli*, uma região antigênica contendo 105 aminoácidos na porção C-terminal da VP3. A reatividade encontrada no FM foi confirmada por Jagadish; Azad (1991) que identificaram um epitopo de 58 aminoácidos na porção média da VP3 contra anticorpos monoclonais em *dot-blot*.

Os anticorpos monoclonais utilizados nas pesquisas de mapeamento da VP3, por serem muito específicos, reconhecem apenas um epitopo. Não encontramos na literatura estudos de mapeamento da VP3 com anticorpos policlonais de galinhas, os quais foram utilizados neste estudo para avaliar a multiplicidade de epitopos encontrados ao longo da rVP3.

Para estabelecer a localização mais precisa dos epitopos os fragmentos maiores foram subdivididos em fragmentos menores, com 50 aminoácidos. Com esta abordagem foram verificadas duas regiões de maior frequência de epitopos nos fragmentos 2 e 7, embora o fragmento 2 tenha apresentado baixa reatividade (menor D.O.). O fragmento 3 não é antigênico pois não houve reação com os soros analisados. A região mais reativa da proteína foi encontrada no fragmento 7, seguido pelos fragmentos 5 e 6. As regiões menos reativas foram encontradas nos fragmentos 1, 2 e 4. Os epitopos encontrados nos fragmentos 4 e 6 neste estudo corroboram os resultados obtidos por Deng et al. (2007). Os autores expressaram a VP3 em *E. coli* e

utilizaram a técnica de pepscan para obter peptídeos que foram avaliados por western blot e ELISA contra anticorpos monoclonais. Os resultados revelaram os epitopos MGIYFATPEW e GQAEPPQAFIDEV localizados, neste estudo, nos fragmentos 4 e 6.

Epitopos localizados na VP3 são específicos para cada sorotipo ou são comuns para os dois sorotipos (OPPLING ET AL., 1991). Mahardika; Becht (1995) localizaram precisamente esses epitopos. Fragmentos da proteína VP3 da cepa Cu-1 reagiram em *imunoblot* contra anticorpos monoclonais anti-VP3 para galinha e peru. Verificaram na porção anterior duas regiões antigênicas reagentes com os dois sorotipos, denominadas de A e B, e na porção posterior, duas regiões C e D que reagiram especificamente com anticorpos do sorotipo I e II. Os fragmentos 1 ao 4 são pouco reativos e corresponderam às regiões A e B onde estão localizados os epitopos comuns aos dois sorotipos propostos por Mahardika; Becht (1995). As regiões C e D específicas para os sorotipos I e II corresponderam aos fragmentos 5, 6 e 7. Este estudo mostrou que as regiões mais reativas da proteína podem conter os epitopos específicos para o sorotipo I, segundo Mahardika; Becht (1995). Antes de considerar a utilização dos fragmentos no diagnóstico dos soros de galinhas, seria necessário avaliá-los contra o sorotipo II. A reação fraca do F1, localizado na região N-terminal da VP3, discorda dos resultados de Mahardika; Becht (1995) que não localizou epitopos nessa região da proteína.

Cabe destacar que a porção C-terminal com 105 aminoácidos, hidrofílica e rica em aminoácidos carregados é responsável pelas atividades da VP3. Neste estudo foi observado que região C-terminal da VP3 é a região antigênica mais reativa e com maior frequência de epitopos, o que pode ser explicado por sua característica hidrofílica. Outras funções atribuídas à VP3 são desempenhadas pela porção C-terminal: estabilização do capsídeo (SAUGAR et al., 2005), promoção a atividade da polimerase (CASAÑAS et al., 2008) e oligomerização da proteína para montagem do capsídeo (MERTENS et al., 2015).

## 7 CONCLUSÕES

Neste trabalho as 10 sequências gênicas sintetizadas comercialmente foram clonadas em vetores de expressão seguindo as estratégias de clonagem estabelecidas. A sequência da proteína VP3 e fragmentos fusionados ou não à GFP foram expressos em *E. coli* cepa BL21 Star, após testar vários protocolos de expressão. A VP2 não foi expressa em células de insetos com o sistema de clonagem pMIB/V5-his. A expressão solúvel da proteína VP2 em *E. coli* apresentou baixo rendimento.

A proteína de fusão GFP aumentou a massa molecular dos peptídeos e atuou como indicador para verificar a expressão da proteína e promoveu a solubilidade dos fragmentos da proteína VP3 quando a expressão foi induzida a 20 °C.

O *slot blot* revelado por quimioluminescência apresentou resultados inconsistentes e não reprodutíveis para mapear as regiões antigênicas.

A reatividade da proteína rVP3 foi avaliada em teste de ELISA contra soros de animais imunizados, vacinados ou com anticorpos maternos. Os resultados demonstraram que o teste pode ser utilizado para avaliar o *status* imunológico pós-vacinal dos animais. A utilização da rVP3 para diagnosticar a presença/ausência da doença em animais não vacinados e não confinados deve ser melhor avaliada utilizando uma amostragem maior desses animais no teste de ELISA.

Os resultados obtidos no mapeamento das regiões antigênicas e confrontados com os dados disponíveis na literatura revelaram que os fragmentos mais reativos da proteína avaliados neste estudo podem conter os epitopos específicos para o sorotipo I. No entanto, mais testes devem ser conduzidos com soros de animais do sorotipo II antes de considerar a utilização dos fragmentos no diagnóstico do IBDV em galinhas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2016.** Disponível em: <[http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf)>. Acesso em: 9 jul. 2016.
- AL-NATOUR, M. Q. et al. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease vírus. **Avian diseases**, v. 48, n. 1, p. 177–182, 2004.
- AOKI, T. et al. Construction of a fusion protein between protein A and green fluorescent protein and its application to Western blotting. **FEBS Letters**, v. 384, n. 2, p. 193–197, 15 abr. 1996.
- ARNOLD, M. et al. Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Vírus with Whole Recombinant Kluyveromyces lactis Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2012.
- ASSUNÇÃO, T. R. S. Desenvolvimento de Antígenos Recombinantes para Serem Utilizados no Diagnóstico de Reovirose Aviária. Curitiba. Trabalho não publicado. 2016.
- AZAD, A. A. et al. Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavírus. **Virology**, v. 161, n. 1, p. 145–152, 1987.
- AZAD, A. A. et al. Physicochemical and immunological characterization of recombinant host- protective antigen (VP2) of infectious bursal disease vírus. **Vaccine**, v. 9, n. 10, p. 715–22., 1991.
- BAYLISS, C. D. et al. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease vírus strains and identification of a variable region in VP2. **The Journal of general virology**, v. 71 ( Pt 6), p. 1303–12, jun. 1990.
- BD BIOSCIENCES CLONTECH. **pEGFP Vector Information**, 2016. Disponível em: <[http://download.bioon.com.cn/upload/month\\_0912/20091211\\_f3507c489802baf63c61LLGQINAtoi2v.attach.pdf](http://download.bioon.com.cn/upload/month_0912/20091211_f3507c489802baf63c61LLGQINAtoi2v.attach.pdf)>
- BECHT H, MULLER H, M. H. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease vírus. **J. Gen Virol**, v. 69, p. 631–640, 1988.
- BERG, T. P. VAN DEN; MORALES, D.; ETERRADOSSI, N.; RIVALLAN, G.; TOQUIN, D.; RAUE, R.; ZIERENBERG, K.; ZHANG, M. F.; ZHU, Y. P.; WANG, C. Q.; ZHENG, H. J.; WANG, X.; CHEN, G. C.; LIM, B. L.; MULLER, H. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. **Avian Pathology**, v. 33, n. 5, p. 470–76, 2004.
- BERG, T. P.; GONZE, M.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterisation of a virulent strain. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 20, p. 133–43, 1991.
- BERG, T. P. V. D.; MEULEMANS, G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. **Avian pathology**, v. 20, n. 3, p. 409–21, 1991.
- BOOT, H. J. et al. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease vírus

from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. **Journal of virology**, v. 74, n. 15, p. 6701–11, 2000.

BÖTTCHER, B. et al. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. **Journal of virology**, v. 71, n. 1, p. 325–30, jan. 1997.

BRANDT, M. et al. Molecular Determinants of Virulence , Cell Tropism , and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus Molecular Determinants of Virulence , Cell Tropism , and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus. **Journal of virology**, v. 75, n. 24, p. 11974–11982, 2001.

CARDOSO, T. C. et al. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of virus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material. **Avian Pathology**, v. 27, n. 5, p. 450–454, 1998.

CASAÑAS, A. et al. Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. **Structure (London, England : 1993)**, v. 16, n. 1, p. 29–37, jan. 2008.

CESARATTO, F.; BURRONE, O. R.; PETRIS, G. Tobacco Etch Virus protease: a shortcut across biotechnologies. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 239–249, 2016.

CHEVALIER, C. et al. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. **Journal of virology**, v. 78, n. 7, p. 3296–303, abr. 2004.

COULIBALY, F. et al. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 761–72, 25 mar. 2005.

CUI, X.; NAGESHA, H. S.; HOLMES, I. H. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display. **Journal of Virological Methods**, v. 114, n. 1, p. 109–112, 2003.

DA COSTA, B. et al. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. **Journal of virology**, v. 76, n. 5, p. 2393–402, mar. 2002.

DENG, X. et al. Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. **Virus research**, v. 129, n. 1, p. 35–42, out. 2007.

DEY, S. et al. Formation of subviral particles of the capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus and its application in serological diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 157, n. 1, p. 84–89, 2009.

DOBOS, P. et al. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **J. Virol.**, v. 32, n. 2, p. 593–605, nov. 1979.

DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Optimizing Inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under control of the lac promotor. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 145–154, 1996.

EIDSON, C. S. et al. Comparison of Inactivated and Live Infectious Bursal Disease Virus Vaccines in White Leghorn Breeder Flock. **Poultry science**, v. 59, p. 2708–2716, 1980.

EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of virology**, v. 55, n. 3, p. 836–9, 1985.

ESCAFFRE, O. et al. Both Genome Segments Contribute to the Pathogenicity of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus. **Journal of Virology**, v. 87, n. 5, p. 2767–2780, 2013.

ETERRADOSSI, N.; SAIF, Y. M. Infectious bursal disease. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. L. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 13th. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2013. p. p.219–46.

FAHEY, K. J.; ERNY, K.; CROOKS, J. A Conformational Immunogen on VP-2 of Infectious Bursal Disease Virus that Induces Virus-neutralizing Antibodies that Passively Protect Chickens CSIRO Division of Animal Health , Animal Health Research Laboratory , Private Bag No . 1 ,. **J Gen Virol**, v. 70, n. 6, p. 1473–1481, 1989.

FAHEY, K. J.; O'DONNELL, I. J.; AZAD, A. A. Characterization by Western blotting of the immunogens of infectious bursal disease virus. **The Journal of general virology**, v. 66 ( Pt 7), p. 1479–88, jul. 1985.

FERNANDES, M. J. B. et al. Partial VP1 sequencing of brazilian infectious bursal disease virus strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1015–1021, 2012.

FERRERO, D. et al. Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. **Journal of virology**, v. 89, n. 21, p. 11165–8, nov. 2015.

FUSSELL, L. W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. **Poultry science**, v. 77, n. 8, p. 1193–1196, 1998.

GARRIGA, D. et al. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 51, p. 20540–5, 18 dez. 2007.

GAY, L.; MUNDT, E. Testing of a new disinfectant process for poultry viruses. **Avian diseases**, v. 54, n. 1 Suppl, p. 763–7, 2010.

GE, J. et al. Construction of Recombinant Baculoviruses Expressing Infectious Bursal Disease Virus Main Protective Antigen and Their Immune Effects on Chickens. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132993, jan. 2015.

GEERLIGS, H. J. et al. Efficacy , Safety , and Interactions of a Live Infectious Bursal Disease Virus Vaccine for Chickens Based on Strain IBD V877 Efficacy , Safety , and Interactions of a Live Infectious Bursal Disease Virus Vaccine for Chickens Based on Strain IBD V877. **Avian diseases**, v. 59, n. 1, p. 114–121, 2015.

GHARAIBEH, S.; MAHMOUD, K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. **Poultry science**, v. 92, n. 9, p. 2333–6, 2013.

GÓMEZ, E. et al. Transient expression of VP2 in Nicotiana benthamiana and its use as a plant-based vaccine against Infectious Bursal Disease Virus. **Vaccine**, v. 31, n. 23, p. 2623–2627, 2013.

HADDAD, E. E. et al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. **Avian diseases**, v. 41, n. 4, p. 882–9, 1997.

HEINE, H. G. et al. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. **The Journal of general virology**, v. 72 ( Pt 8), n. 8, p. 1835–43, 1 ago. 1991.

HIRAI, K.; SHIMAKURA, S. Structure of infectious bursal disease vírus. **Journal of virology**, v. 14, n. 4, p. 957–64, out. 1974.

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY. **Vírus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Víruses - Part II: The Víruses - Family Birnaviridae.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000458>>.

IEDB IMMUNE EPIOTOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE. **B Cell Epitope Prediction Tools - Prediction of linear epitopes from protein sequence.** Disponível em: <<http://tools.iedb.org/bcell/>>.

IGNJATOVIC, J. et al. Chicken recombinant antibodies against infectious bursal disease vírus are able to form antibody-vírus immune complex. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A.**, v. 35, n. 4, p. 293–301, 2006.

IKUTA, N. et al. Molecular Characterization of Brazilian Infectious Bursal Disease Víruses. **Avian Diseases**, v. 45, n. 2, p. 297–306, 2001.

INGRAO, F. et al. Infectious Bursal Disease: A complex host–pathogen interaction. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 429–438, 2013.

INVITROGEN. **Manual pMIB/V5-His A, B, and C Vector Kit**, 2016a.

INVITROGEN. **BL21 Star™(DE3) One Shot® BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells**, 2016b. Disponível em: <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21star_man.pdf)>

IVÁN, J. et al. Delayed vaccine vírus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: Quantification of vaccine vírus by real-time polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 2, p. 135–142, 2005.

JACOBSON, R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 2, p. 469–526, 1998.

JAENISH, F. R. F. **Biossegurança e Cuidados Sanitários para Frangos.** Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.php?codigo=18>>. Acesso em: 9 jul. 2016.

JAGADISH, M. N. et al. Birnavírus precursor polyprotein is processed in Escherichia coli by its own vírus-encoded polypeptide. **J. Virol.**, v. 62, n. 3, p. 1084–1087, 1988.

JAGADISH, M. N.; AZAD, A. A. Localization of a VP3 epitope of infectious bursal disease vírus. **Virology**, v. 184, n. 2, p. 805–807, 1991.

JIANG, D. et al. High level soluble expression and one-step purification of IBDV VP2 protein in Escherichia coli. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 901–908, 22 jun. 2016.

KNEIPP, C. A. F. **A doença de gumboro no Brasil** Simpósio de Sanidade Avícola Santa Maria, RS, 2000.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1-2, p. 172–174, 1990.

LAZARUS, D. et al. Attenuation of very virulent infectious bursal disease vírus and

comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 37, n. 2, p. 151–9, 8 abr. 2008.

LEE, C. C. et al. Crystal structure of infectious bursal disease vírus VP2 subviral particle at 2.6 Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity. **Journal of Structural Biology**, v. 155, n. 1, p. 74–86, 2006.

LEE, M. S. et al. Characterization of particles formed by the precursor protein VPX of infectious bursal disease vírus in insect Hi-5 cells: Implication on its proteolytic processing. **Journal of Virological Methods**, v. 121, n. 2, p. 191–199, 2004.

LETZEL, T. et al. Molecular and Structural Bases for the Antigenicity of VP2 of Infectious Bursal Disease Vírus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 23, p. 12827–12835, 1 dez. 2007.

LIU, H. . et al. Molecular characterisation of very virulent infectious bursal disease víruses in Taiwan. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 139–147, 2001.

LUQUE, D. et al. Infectious Bursal disease vírus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA vírus. **Journal of molecular biology**, v. 386, n. 3, p. 891–901, 27 fev. 2009.

MAAS, R. A. et al. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD vírus strains of varying virulence. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 30, n. 4, p. 345–54, 2001.

MAHARDIKA, G. N.; BECHT, H. Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease vírus (IBDV). **Archives of virology**, v. 140, n. 4, p. 765–74, 1995.

**MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.**  
**Animais - Espécies - Aves.** Disponível em:  
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 9 jul. 2016.

MARAVÉ, A. et al. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease vírus, plays a critical role in capsid assembly. **Journal of virology**, v. 77, n. 11, p. 6438–49, jun. 2003.

MARTINEZ-TORRECUADRADA, J. L. et al. Antigenic Properties and Diagnostic Potential of Baculovirus- Expressed Infectious Bursal Disease Vírus Proteins VPX and VP3. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 4, p. 645–651, 2000a.

MARTINEZ-TORRECUADRADA, J. L. et al. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease vírus capsid proteins expressed in insect cells. **Virology**, v. 278, n. 2, p. 322–31, 20 dez. 2000b.

MCFERRAN, J. B. et al. Isolation and serological studies with infectious bursal disease víruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 9, n. 3, p. 395–404, jul. 1980.

**MDCI - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR.** Comércio exterior. Estatística de comércio exterior. Séries históricas. Grupos de produtos: exportação (Janeiro 1997 - Julho 2016). Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/series-historicas>. Acesso em: 9 jul. 2016.



MERTENS, J. et al. A protein with simultaneous capsid scaffolding and dsRNA-binding activities enhances the birnavirus capsid mechanical stability. **Scientific reports**, v. 5, p. 13486, 4 jan. 2015.

MÜLLER, H. et al. Current status of vaccines against infectious bursal disease. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 41, n. 2, p. 133–9, 2012.

MÜLLER, H.; BECHT, H. Biosynthesis of vírus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease vírus and their significance as structural elements for infectious vírus and incomplete particles. **Journal of virology**, v. 44, n. 1, p. 384–92, 1982.

MÜLLER, H.; ISLAM, M. R.; RAUE, R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 153–165, 2003.

MÜLLER, H.; NITSCHKE, R. The two segments of the infectious bursal disease vírus genome are circularized by a 90,000-Da protein. **Virology**, v. 159, n. 1, p. 174–177, 1987a.

MÜLLER, H.; NITSCHKE, R. Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease vírus, a member of the birnavirus group. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 176, n. 2, p. 113–121, 1987b.

MÜLLER, H.; SCHOLTISSEK, C.; BECHT, H. The genome of infectious bursal disease vírus consists of two segments of double-stranded RNA. **Journal of virology**, v. 31, n. 3, p. 584–9, set. 1979.

MUNDT, E.; BEYER, J.; MÜLLER, H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease vírus-infected cells. **The Journal of general virology**, v. 76 ( Pt 2), p. 437–43, fev. 1995.

MUNDT, E.; DE HAAS, N.; VAN LOON, A. A. W. M. Development of a vaccine for immunization against classical as well as variant strains of infectious bursal disease vírus using reverse genetics. **Vaccine**, v. 21, n. 31, p. 4616–4624, 2003.

NAGARAJAN, M. M.; KIBENGE, F. S. B. Infectious Bursal Disease Vírus : A Review of Molecular Basis for Variations in Antigenicity and Virulence. **Can J Vet res**, v. 61, p. 81–88, 1997.

NAKANO, M. et al. Ocorrência da “Doença de Gumboro” no Brasil. **Biológico**, v. 38, p. 60–61, 1972.

NEB, N. E. B. **Cleavage Close to the End of DNA Fragments (oligonucleotides)**. Disponível em: <[http://www.neb.com/~media/NebUs/Files/Chart image/cleavage\\_oligonucleotides\\_old.pdf](http://www.neb.com/~media/NebUs/Files/Chart%20image/cleavage_oligonucleotides_old.pdf)>.

NEB, N. E. B. **SHuffle® T7 Express Competent E. coli**. Disponível em: <<https://www.neb.com/products/c3029-shuffle-t7-express-competent-e-coli#pd-description>>.

NICK, H.; CURSIEFEN, D.; BECHT, H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease vírus. **Journal of virology**, v. 18, n. 1, p. 227–34, abr. 1976.

NOAD, R.; ROY, P. Vírus-like particles as immunogens. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 438–444, 2003.

NOVAGEN. **pET-28a-c(+) Vectors Map**, 2016a. Disponível em: <[http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET\\_vectors/pET-28a-](http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-)

c\_map.pdf>

NOVAGEN. **Competent cells. What a difference a strain makes**, 2016b. Disponível em:

<[http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Tuner%E2%84%A2%28DE3%29pLys-S-Competent-Cells---Novagen,EMD\\_BIO-70624?bd=1#documentation](http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Tuner%E2%84%A2%28DE3%29pLys-S-Competent-Cells---Novagen,EMD_BIO-70624?bd=1#documentation)>

NUNOYA, T. et al. Occurrence of Acute Infectious Bursal Disease with High Mortality in Japan and Pathogenicity of Field Isolates in Specific-Pathogen-Free Chickens. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 597–609, 1992.

OIE. **World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

OMAR, A. R. et al. Efficacy of VP2 protein expressed in E. coli for protection against highly virulent infectious bursal disease vírus. **Journal of veterinary science**, v. 7, n. 3, p. 241–7, set. 2006.

OPPLING, V.; MULLER, H.; BECHT, H. The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease vírus carries group- and serotype-specific epitopes. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 9, p. 2275–2278, 1991.

PAPANEOPHYTOU, C.; KONTOPIDIS, G. A comparison of statistical approaches used for the optimization of soluble protein expression in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 126–137, 2016.

PARKER, D.; DE WIT, S. Assessment of impact of a novel infectious bursal disease (IBD) vaccination programme in breeders on IBD humoral antibody levels through the laying period. **Veterinary Record Open**, v. 1, n. 1, p. e000016–e000016, 2014.

PITCOVSKI, J. et al. Failure of Viral Protein 3 of Infectious Bursal Disease Vírus Produced in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems to Protect Chickens Against the Disease. **Avian diseases**, v. 43, n. 1, p. 8–15, 1999.

PRADHAN, S. N. et al. Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease vírus in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 3-4, p. 293–301, 2012.

PROMEGA. **Technical Manual. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems**, 2016. Disponível em:

<<https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>>

QI, X. et al. Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease vírus. **Antiviral Research**, v. 84, n. 3, p. 225–233, 2009.

QI, X. et al. Mutations of Residues 249 and 256 in VP2 Are Involved in the Replication and Virulence of Infectious Bursal Disease Vírus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

RONG, J. et al. Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. **Vaccine**, v. 23, n. 40, p. 4844–51, 23 set. 2005.

RONG, J. et al. Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p. 7900–7908, 2007.

SAIF, Y. M. Immunosuppression induced by infectious bursal disease vírus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 45–50, 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd Ed. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SAPATS, S. et al. An ELISA for detection of infectious bursal disease vírus and differentiation of very virulent strains based on single chain recombinant chicken antibodies. **Avian Pathology**, v. 34, n. 6, p. 449–455, 2005.

SARAVANAN, P.; KUMAR, S.; KATARIA, J. M. Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease vírus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA--quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis. **Journal of immunological methods**, v. 293, n. 1-2, p. 61–70, out. 2004.

SAUGAR, I. et al. Structural Polymorphism of the Major Capsid Protein of a Double-Stranded RNA Vírus: An Amphipathic  $\alpha$  Helix as a Molecular Switch. **Structure**, v. 13, n. 7, p. 1007–1017, 7 jul. 2005.

SCANAVINI NETO, H. et al. Infectious bursal disease vírus: case report and experimental studies in vaccinated and unvaccinated SPF chickens and commercial broiler chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 1, p. 41–54, 2004.

SEDIGHZADEH, S. S.; SHAMSARA, M.; SHAHPURI, A. Fusion protein strategy to increase expression and solubility of hypervariable region of VP2 protein of infectious bursal disease vírus in Escherichia coli. **Protein Journal**, v. 31, n. 7, p. 580–584, 2012.

SHARMA, J. M. et al. Infectious bursal disease vírus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 223–235, 2000.

SINGH, N. K. et al. Evaluation of four enzyme linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to infectious bursal disease in chickens. **Journal of Virological Methods**, v. 165, n. 2, p. 277–282, 2010.

SNYDER, D. B. Changes in the field status of infectious bursal disease vírus. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 19, n. 3, p. 419–423, 1990.

SNYDER, D. B.; VAKHARIA, V. N.; SAVAGE, P. K. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease víruses in the United States. **Archives of Virology**, v. 127, p. 89–101, 1992.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–28, 26 jan. 2005.

SWAYNE, D. E. et al. Antibody titer has positive predictive value for vaccine protection against challenge with natural antigenic-drift variants of H5N1 high-pathogenicity avian influenza víruses from Indonesia. **Journal of virology**, v. 89, n. 7, p. 3746–62, 2015.

TACKEN, M. G. J. et al. VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease vírus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4All. **Archives of Virology**, v. 149, n. 11, p. 2245–2260, 2004.

TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I. Ocorrência da doença de gumboro em aves de postura causadas por cepas hipervirulentas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 115–17, 2001.

TO, H. et al. Sequence comparison of the VP2 variable region of infectious bursal

disease virus isolates from Vietnam. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 61, n. 4, p. 429–32, 1999.

TODD, D. et al. Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of chicken anaemia virus. **Journal of Virological Methods**, v. 82, n. 2, p. 177–184, 1999.

TSUKAMOTO, K. et al. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. **Avian diseases**, v. 39, n. 2, p. 218–229, 2013.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial cell factories**, v. 3, n. 1, p. 11, 2004.

VAZIRY, A. et al. Prediction of Optimal Vaccination Timing for Infectious Bursal Disease Based on Chick Weight. **Avian diseases**, v. 51, n. 4, p. 918–923, 2014.

**Viralzone.** **Avibirnavirus.** Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/293.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/293.html)>. Acesso em: 25 jun. 2016.

WALDO, G. S. et al. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 691–5, 1999.

WANG, M. et al. An optimized, highly efficient, self-assembled, subvirus-like particle of infectious bursal disease virus (IBDV). **Vaccine**, v. 34, n. 30, p. 3508–3514, 2016.

WANG, M. Y. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting infectious bursal disease virus (IBDV) infection based on the VP3 structural protein. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 3-4, p. 229–236, 2008.

WANG, X.-N. et al. Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage-displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping. **Viral immunology**, v. 18, n. 3, p. 549–57, 2005.

WU, Y. et al. The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. **Archives of Virology**, v. 154, n. 12, p. 1873–1882, 2009.

XU, X.-G. et al. Baculovirus virions displaying infectious bursal disease virus VP2 protein protect chickens against infectious bursal disease virus infection. **Avian diseases**, v. 55, n. 2, p. 223–9, 2011.

YAMAGUCHI, T. et al. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. **Archives of virology**, v. 141, p. 1493–1507, 1996.

ZIERENBERG, K. et al. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, “classical” virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. **Archives of virology**, v. 145, p. 113–125, 2000.